

بررسی فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ TEM در

ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران

سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران

صفحه

عناوین

چکیده.....	۴
مقدمه و اهمیت موضوع.....	۷
معرفی سودوموناس آئروژینوزا.....	۷
ویژگی های بیولوژیک و بیوشیمیایی.....	۸
عوامل موثر در بیماری زایی.....	۸
عفونت های بالینی.....	۹
درمان.....	۱۰
کنترل.....	۱۱
مقاومت های دارویی.....	۱۲
مکانیسم های ایجاد مقاومت در باکتری ها.....	۱۳
منشاء غیر ژنتیکی مقاومت.....	۱۷
منشاء ژنتیکی مقاومت.....	۱۷
اینترگون ها.....	۱۸
پنی سیلین های طبیعی.....	۲۰
پنی سیلین های نیمه صناعی.....	۲۰

۲۱.....	سفالوسپورین ها و سفامايسين ها.....
۲۳	کارباپنم ها.....
۲۴.....	مونوباکتام ها.....
۲۶.....	اصول طبقه بندی بتالاكتامازها.....
۳۳.....	تعريف آمينوگلیکوزیدها.....
۳۴.....	مکانيسم های مقاومت به فلوروکینولونها.....
۳۵.....	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش مراقبت ویژه (ICU)
۳۶	اهمیت بالینی جداسازی ژن TEM.....
۳۶.....	فاکتورهای خطر در انتشار اینتگرون ها
۳۷.....	روش های کنترل عفونت.....
۳۸.....	هدف اصلی.....
۳۸.....	اهداف فرعی.....
۳۸.....	اهداف کاربردی.....
۳۸.....	فرضیات یا سوالات پژوهشی.....
	فصل دوم
۳۹.....	مروری بر مطالعات انجام شده.....
	فصل سوم
۴۱.....	جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری.....
۴۲	نمونه برداری.....
۴۳.....	تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Agar Diffusion.....
۴۵.....	بررسی ملکولی شیوع ژن SHV.....
۴۵.....	استخراج DNA.....
۴۶.....	آماده سازی پرایمرها.....
۴۶.....	انجام آزمون PCR
۴۷	آماده سازی واکنش PCR

۴۸.....	برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler)
۴۹.....	الکتروفورز محصولات PCR
۵۰.....	کنترل کیفی
۵۱.....	بررسی ارتباط بین حضور ژن TEM و مقاومت آنتی بیوتیکی
فصل چهارم	
۵۲.....	یافته ها
۵۵.....	الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی
۵۵.....	شناسایی ملکولی ژن TEM
۵۷.....	ارتباط مابین حضور ژن TEM و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی
فصل پنجم	
۵۸.....	بحث و نتیجه گیری نهایی
۶۴.....	پیشنهادهات
۶۵.....	منابع

جداول و نمودارها

- جدول ۱-۱: طبقه بندی بتالاکتامازها..... ۲۹
- جدول ۱-۲: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی A با منشا اینتگرون..... ۳۱
- جدول ۱-۳: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی B با منشا اینتگرون..... ۳۲
- جدول ۱-۴: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی D با منشا اینتگرون..... ۳۳
- تصویر ۱-۳: انجام کشت مجدد نمونه ها و انجام ذخیره سازی..... ۴۳
- جدول ۱-۳: مقادیر بهینه برای تهیه master mix یک واکنش PCR..... ۴۷
- جدول ۲-۳: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR..... ۴۸
- جدول ۳-۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در یک واکنش PCR..... ۴۹
- تصویر ۲-۳: انجام الکتروفورز محصول PCR..... ۵۰
- تصویر ۱-۴: نتایج آزمونهای فنوتیپی تعیین هویت..... ۵۲
- نمودار ۱-۴: فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر حسب بخش های بیمارستانی..... ۵۳
- نمودار ۲-۴: فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر حسب نمونه های بالینی..... ۵۴
- نمودار ۳-۴: فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر حسب جنس..... ۵۴
- تصویر ۲-۴: حضور ژن TEM در آزمون PCR..... ۵۶
- جدول ۱-۴: حضور اینتگرون کلاس یک در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت دارویی
- چندگانه..... ۵۶
- جدول ۲-۴: بررسی مقایسه ای الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا اینتگرون
- مثبت و منفی..... ۵۷

چکیده:

معرفی: علیرغم پیشرفت های زیاد در سیستم های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) همچنان بعنوان یکی از مهمترین پاتوژنهای ایجاد کننده عفونتهای بیمارستانی بخصوص در بخش های مراقبت ویژه و سوختگی مطرح است. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن TEM در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا و الگوهای مقاومت دارویی در ایزوله های این ارگانیسم است.

روش کار: در مجموع ۱۴۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان سوختگی مورد مطالعه در تهران جمع آوری شد. تمامی ایزوله ها ابتدا با روش های استاندارد آزمایشگاهی تعیین هویت شدند و سپس الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در برابر آنتی بیوتیک های منتخب به روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن (کربی بوئر) مطابق دستورالعمل CLSI انجام شد. در ادامه تمامی ایزوله ها از نظر حضور ژن TEM با استفاده از آزمون PCR بررسی شدند.

نتایج: از مجموع ۱۴۷ ایزوله، ۶۲ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند. در بین ایزوله های با مقاومت دارویی چندگانه، ۵۲ ایزوله (۳۷/۳۵٪) دارای ژن TEM بودند.

بحث: نتایج این مطالعه حاکی از شیوع بالای ژن TEM در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان های مورد مطالعه است. با توجه به حضور گونه های مقاوم جدا شده از بیمارستان های مورد مطالعه، اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی در بخش های مختلف بیمارستان مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری است.

مقدمه و اهمیت موضوع: در حال حاضر، درمان عفونتهای ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا به علت فاکتورهای ویروالانس، مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی در برابر عوامل ضد میکروبی و نیز محدود بودن آنتی بیوتیک‌های موثر اغلب مشکل می باشد. در واقع توانایی این ارگانیسم در گسترش مقاومت‌های چند دارویی باعث مشکلات عمده درمانی شده است. بنا به اهمیت آن شناسایی این ارگانیسم‌های مقاوم اهمیت زیادی در درمان مناسب بیماران بخصوص بیماران بدحال بستری در بیمارستان و همچنین جلوگیری از گسترش مقاومت دارویی دارد. کاربرد بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونتهای باکتریایی، موجب انتخاب سویه‌های مقاوم شده است و متأسفانه خطر انتقال ژن‌های مقاومت از سویه‌های مزبور به باکتری‌های حساس رو به افزایش می باشد. در سال ۱۹۹۵ Hall و Collis مکانیسم دیگری از انتقال ژن‌های عامل مقاومت‌های دارویی را شناسایی کردند که توسط فاکتورهایی به نام اینتگرون انجام می شود. اینتگرون‌ها مجموعه‌ای ژنتیکی حاوی پروموتور می باشند که قادرند عناصر ژنتیکی متحرک موسوم به بسته ژنی (gene cassette) را در خود ادغام کرده و آنرا جا بجا نمایند. با توجه قرارگیری ژنهای مربوط به این نوع مقاومت‌ها بر روی اینتگرون‌ها که امکان انتشار سریع این ژن‌ها را در بین سایر گونه‌ها فراهم می آورد شناسایی حضور این اینتگرون‌ها می تواند اطلاعات مفیدی در مورد میزان شیوع سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم، رهگیری نحوه انتشار و توسعه مقاومت را ارائه دهد.

معرفی سودوموناس آئروژینوزا:

گونه‌های سودوموناس باسیل‌های گرم منفی هوازی، غیر تخمیری و ساکن خاک و آب هستند که به عنوان ارگانیسم‌های فرصت طلب به ویژه در بیمارانی که دارای ضعف در سیستم دفاعی هستند، منجر به عفونت‌های شدید و مقاوم به درمان می شوند.

سودوموناس آئروژینوزا شایع ترین گونه جنس سودوموناس است که غالباً "به دنبال عفونت های بالینی ناشی از این ارگانیسم ها جدا می شود. این ارگانیسم بر اساس مطالعات مختلفی که در این زمینه در اقصی نقاط جهان انجام می شود در حال حاضر به عنوان سومین گونه باکتریایی شایع در عفونت های انسانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی می باشد (۱، ۲).

ویژگی های بیولوژیک و بیوشیمیایی:

سودوموناس آئروژینوزا قابلیت بسیار بالایی برای بقا در طبیعت دارد و بیشتر در محیط های مرطوب زندگی می کند. این ارگانیسم حتی توانایی رشد در آب مقطر را نیز دارد. در آزمایشگاه، این ارگانیسم در اکثر محیط های کشت قابل جدا سازی است. درجه حرارت ایتیمم رشد این ارگانیسم ۳۵ درجه سانتی گراد است؛ اما توانایی رشد در محدوده دمایی ۱۰ تا ۴۲ درجه سانتی گراد را دارد. در محیط های بیمارستانی این ارگانیسم از نقاط مختلف از جمله دستگاه تنفس مصنوعی، حمام ها، دستگاه های خنک کننده، تختها و کف زمین قابل جدا سازی است. یکی از دلایل این امر مقاومت این ارگانیسم در برابر ضد عفونی شیمیایی است که به آن توانایی بقا و رشد در برابر انواع ترکیبات آمونیم چهارتایی، صابون، هگزا کلروفن و محلول های ید را می دهد (۳، ۲).

عوامل موثر در بیماری زایی :

دو شکل متفاوت از این ارگانیسم از جمله یک شکل آزاد و یک شکل میکروکلونی از این ارگانیسم وجود دارد. شکل گلیکوکالیس توانایی استقرار و قابلیت بقا ارگانیسم را در محیط های بیمارستانی و حتی بیماران فراهم می سازد. شکل میکروکلونی این ارگانیسم به ویژه در بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک و همچنین در مئانه بیمارانی که پس از سوندهای داخل مئانه ای به عفونت سودوموناس آئروژینوزا مبتلا می شوند، نقش اساسی دارد. لیپوپلی ساکارید پوشش سلولی یا

اندوتوکسین سودوموناس آئروژینوزا هم نقش مهمی در بیماری زایی آن در عفونت های انسانی را بر عهده دارند (۴،۱).

عفونت های بالینی :

این ارگانیسم به عنوان یک بیماریزای فرصت طلب غالبا" در افراد با ضعف ایمنی، سوختگی ، زخم های ناشی از ضربه و به هنگام استفاده از کاتتر یا لوله گذاری تنفسی ایجاد بیماری می کند (۵).

همچنین بیماران مبتلا به سرطان و معتادین تزریقی از دیگر بیماران مستعد به عفونت های ناشی از این ارگانیسم هستند که غالبا" در ادامه مستعد ابتلا به اندوکاردیت و استئومیلیت سودومونایی هستند. عفونت قرنیه به ویژه در افرادی که با مایعات آلوده شستشوی لنز و فراورده های آرایشی را انجام می دهند و عفونت گوش خارجی و فولیکولیت در بیماران مرتبط با لوله های آب گرم یا استخرها از دیگر موارد بیماری های ناشی از این ارگانیسم می باشند (۶).

در مجموع این ارگانیسم می تواند هر نقطه ای از بدن را گرفتار کند از جمله: بافت قرنیه، سیستم ادراری، ریه ها، ضایعات موضعی در سوختگی ها یا زخم ها . در بیماران مبتلا به سپتی سمی مرگ و میر بالایی وجود دارد و در موارد نقص ایمنی به حدود ۸۰٪ می رسد. تقریبا ۳۰٪ بیماران با سپتی سمی سودومونایی علائم اکتیماگانگرنوزوم را تجربه می کنند. پنومونی سودومونایی مرگ و میر حدود ۷۰٪ دارد که با علائمی همچون کاهش هوشیاری ، سیانوز پیشرونده و آمپیم و انفلتراسیون لوب های تحتانی ریه همراه است (۷).

عفونت ادراری ناشی از سودوموناس آئروژینوزا غالبا" در کسانی که از سوند یا کاتتر استفاده می کنند یا سیستوسکوپی شده اند دیده می شود. در اغلب موارد عفونت های سیستم ادراری به عنوان یک منشا مهم انتشار ارگانیسم در سایر نقاط بدن عمل می کند. اندوکاردیت سودومونایی یکی از عوارض باکتریایی مخصوصا در معتادان تزریقی است. به هنگام اندوکاردیت، امکان درگیری همه

دریچه های قلب مخصوصا دریچه سه لتی وجود دارد. معتادان تزریقی استعداد ابتلا به استئومیلیت مهره ای یا ترقوه ای را دارند که احتمالا به علت انتشار از طریق ورید هایی است که به موازات مهره های کمری هستند. در سالمندانی که بیماری زمینه ای مثل دیابت دارند؛ دچار استئومیلیت استخوان گیجگاهی در محل خروج اعصاب جمجمه ای می شوند که مهمترین عارضه ی آن، انتشار عفونت در استخوان پتروس و بروز آبسه مغزی می باشد (۱، ۸).

عفونت های چشمی سودوموناس معمولا ناشی از خراش های لنزهای تماسی و پدهای چشمی جراحی می باشد؛ که به دنبال بروز یک زخم نهایتا "پان افتالمی و تخریب چشم توسط پروتئازها اتفاق خواهد افتاد (۹).

استفاده از کیسه ی آب گرم عاملی برای افزایش عفونت پوستی سودوموناس ائروژینوزا است. چند ساعت پس از تماس با کیسه ها یا اسفنجهای آب گرم، سندرم ویژه ای با علائم لکه های ویزیکولی یا پوستولی، ضعف و بی حالی، خستگی و التهاب گوش خارجی بروز می کند. ماستیت و فولیکولیت هم از دیگر عفونتهای سودومونایی می باشد (۸، ۹).

درمان :

عفونتهای ایجاد شده بوسیله سودوموناس ائروژینوزا اغلب شدید و تهدیدکننده حیات می باشند. به علت میزان بالای پیدایش مقاومت آنتی بیوتیکی طی پروسه های درمانی و نیز حساسیت این باکتری به تعداد محدودی از عوامل ضد میکروبی، درمان عفونتهای ناشی از آن مشکل بوده و در نهایت عواقب زیانباری در پی دارد.

مهمترین فاکتورهایی که در کنترل بیماریزایی این ارگانیسم کاربرد دارند عوامل پیشگیری کننده از لانه گزینی، کنترل بیماری های زمینه ای و تقویت سیستم ایمنی فرد است. درمان گونه های سودوموناس ائروژینوزا در برابر آمینوگلیکوزیدها و پنی سیلین وسیع الطیف در حال حاضر با

مشکلات جدی مواجه شده است. به ویژه اگر درمان طولانی مدت باشد یا از داروهای بتالاکتام به تنهایی استفاده شود غالباً "مقاومت نسبت به این داروها بروز می کند. در عفونت های جدی و وخیم ترکیبی از دوز های بالای آمینوگلیکوزیدها و پنی سیلین وسیع الطیف توصیه می گردد. سفالوسپورین های نسل سوم در درمان عفونت های سیستم عصبی و مبتلایان به عفونت که نارسایی کلیوی دارند ترجیح داده می شوند (۱۰).

کینولونها و کارباپنم ها هم از جمله داروهای ضد سودومونایی محسوب می شوند. سیپروفلوکساسین مثالی از یک کینولون با فعالیت خوب ضد سودومونایی است و ایمنی پنم که اولین آنتی بیوتیک از مجموعه دارو های کارباپنم با مصرف بالینی است.

در درمان عفونت های سوختگی تلاش در جهت نگهداری تعداد ارگانیزم ها به میزان کمتر از ۱۰۰ هزار در هر گرم بافت می باشد تا از بروز سپتی سمی ممانعت شود. در موارد سوختگی ، کاربرد موضعی برخی از کرم ها به همراه استفاده از آنتی بیوتیک ها پذیرفته شده ترین شکل درمان است. در بیماران سرطانی ، درمان ایمونولوژیک در شکل گاماگلوبولین، هیپرایمئون و ترانسفوزیون گرانولوسیت با موفقیت هایی همراه بوده است (۱۱).

کنترل :

جلوگیری از گسترش سودوموناس آئروژینوزا در محیط های بیمارستانی بعلت وجود مکانیزم های ذاتی و اکتسابی مقاومت به عوامل ضد میکروبی اغلب مشکل است. کنترل در واقع همان جلوگیری از لانه گزینی و تکثیر مبتلایان به سودوموناس آئروژینوزا در موضع عفونت می باشد. حذف کردن این ارگانیزم از محیط تقریباً غیر ممکن است اما مراقبت کردن مناسب از دستگاههای تنفسی مصنوعی و جلوگیری از تجمع آب و محافظت مناسب از محیط های مرطوب به ویژه در محیط های بیمارستانی از انتشار و تکثیر ارگانیزم می کاهد . ساخت واکسن در حال بررسی است.

محققین معتقدند به جای واکسینه کردن ، بهتر است از ایمونیزاسیون غیر فعال استفاده شود. در مطالعاتی که بر روی حیوانات انجام شده و همچنین بر روی نمونه های بالینی نیز نتایج امیدوار کننده ای حاصل شده است (۱۰).

مقاومت های دارویی:

داروهای ضد میکروبی از پرمصرف ترین انواع داروها هستند که در صورت استفاده صحیح نجات بخش خواهند بود و در عین حال استفاده نادرست و نابجا، باعث افزایش هزینه، عوارض، مقاومت دارویی، و بی ارزش شدن آنها می گردد. استفاده منطقی از داروهای ضد میکروبی، به فهم نحوه عملکرد، فارماکوکنتیک ، عوارض دارویی، تداخلات و روش های کاهش مقاومت و حساسیت میکروبی در آزمایشگاه بستگی دارد. پدیده بروز "مقاومت دارویی" چند سال است که توجه دانشمندان و محافل علمی را به خود جلب کرده است. پیش بینی می شود که با وجود سرعت بسیار بالای ایجاد مقاومت دارویی تا چند دهه دیگر همه آنتی بیوتیک ها بی اثر خواهند شد و این، یعنی این که شاید بشر به دوران قبل از کشف پنی سیلین باز گردد! زیرا هر از گاهی گزارشاتی جدید از بروز مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها منتشر می گردد. در حال حاضر پزشکان در درمان بیماران مبتلا به این میکروارگانیسم های مقاوم، دچار محدودیت های فراوانی می باشند؛ چرا که به سبب بروز مقاومت های متنوع دارویی، بسیاری از این داروهای شگفتی آفرین که تا کنون زندگی انسان های بی شماری را نجات داده اند، به آخر خط رسیده اند.

منظور از مقاومت آنتی بیوتیکی توانایی باکتری یا سایر میکروب ها به مقاومت در برابر اثر آنتی بیوتیک ها با استفاده از مکانیسم های متفاوت است. اگر چه تعداد زیادی از موارد مقاومت به دارو در باکتری ها یک صفت ذاتی است اما در بسیاری از موارد نیز این پدیده در اثر فشار آنتی بیوتیکی ایجاد شده و در واقع به وسیله ی ارگانیسم کسب می گردد (۱۲-۱۴).

مکانیسم های ایجاد مقاومت در باکتری ها:

- تغییر نفوذ پذیری میکروارگانیسم نسبت به دارو:

کاهش نفوذ پذیری، از طریق عملکرد کانال های غشاء سلولی (پورین ها) اعمال می شود که اجازه ی ورود دارو را به داخل سلول نمی دهند. ژن های این نوع مقاومت، غالبا منشاء پلاسمیدی دارند. (۱۵-۱۷)

- از طریق پمپ افلاکس:

میکروارگانیسم کانال های پروتئینی متعددی در غشاء دارد، که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند. در میان این انتقال دهنده ها، پمپ های efflux نقش اساسی در خروج آنتی بیوتیک ها از داخل سلول داشته و این مواد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می کنند. بنابراین باعث کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها در فضای پری پلاسمی باکتری های گرم منفی می گردند. افزایش بیان یک یا چند پمپ efflux باعث ممانعت از تجمع داخل سلولی، در حد آستانه ی مورد نیاز برای فعالیت داروها می گردد. (۱۸-۲۰)

- تغییر گیرنده های میکروارگانیسم برای داروها:

ژن های این نوع مقاومت ها، غالبا کروموزومی هستند. برای مثال مقاومت به آمینوگلیکوزیدها که منشاء کروموزومی دارد، معمولا همراه با از دست دادن یا تغییر پروتئین هایی است، که بر قطعه ی کوچک ریبوزوم، به عنوان گیرنده ی دارو عمل می

کنند؛ و یا تغییر در پروتئین های اتصال به پنی سیلین ها (PBPs) به ویژه PBP-2 که نقش بسزایی در شکل گیری ساختمان باکتری دارد (۲۱).

- دستیابی میکروارگانیسم به مسیرهای متابولیک فرعی :

این امر، واکنش مهار شده توسط دارو را جبران می نماید. به عنوان مثال در باکتری ها، PABA یکی از عوامل سازنده ی اسید فولیک است. اگر آنزیم "دی هیدرو پتروات سنتتاز" که وظیفه تبدیل PABA به اسیدفولیک را عهده دار است، توسط سولفونامید مهار شود، دیگر نمی تواند در واکنش تبدیل PABA به اسید فولیک شرکت نماید، و در نتیجه اسید فولیک ساخته نمی شود. اسید فولیک در سنتز اسیدهای نوکلئیک نقش مهمی دارد و به همین جهت عدم سنتز آن، به توقف رشد سلول، منجر می گردد. برخی از باکتری ها، نیاز به PABA خارج سلولی ندارند و همانند سلول های پستانداران، می توانند از اسید فولیک از پیش تشکیل شده، استفاده کنند و به همین دلیل به سولفونامید مقاومند (۲۲).

- تولید آنزیم های بتالاکتاماز:

این آنزیم ها سبب تخریب داروی فعال می گردند. ژن های این نوع مقاومت های دارویی اکثراً از طریق پلاسمید منتقل می شوند. برای مثال، پلاسمیدهای مسئول مقاومت نسبت به پنی سیلین و سفالوسپورین ها، دارای ژن های مربوط به سنتز آنزیمی به نام بتالاکتاماز یا پنی سیلیناز می باشند، که حلقه ی بتالاکتام موجود در هسته ی مرکزی این داروها را تخریب کرده و ترکیب غیر فعالی به نام اسید پنی سیلوئیک یا اسید فنولیک باقی می گذارد.

در مجموع، مقاومت با جهش ژن ها یا اکتساب ژن جدید به وجود می آید. ژن های جدید عامل مقاومت، معمولاً سلول به سلول، توسط عناصر متحرک ژنتیکی مثل پلاسمید، ترانس پوزون و باکتریوفاژ منتشر می شوند. هم چنین، ژن های بسیاری از بتالاکتامازهای جدید، بر روی اینتگرون ها یافت شده است. اینتگرون ها، عناصری هستند که می توانند در پلاسمیدها، کروموزوم ها و یا

ترانس پوزون ها جای گیرند. این عناصر از جمله فاکتورهای دخیل، در توسعه ی مقاومت های چندگانه بوده و همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون ها، جزء مولفه های ژنتیکی متحرک، در کسب و انتشار عوامل مقاومت می باشند(۲۳).

مطابق نظریه ترکیبی انتخاب طبیعی، اثبات شده است که در جایی که مقدار زیادی داروهای ضد میکروبی مصرف می شود، باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، به سبب شانس بقای بیشتر نسبت به باکتری های غیر مقاوم(حساس به آنتی بیوتیک)، باقی مانده و تکثیر می کنند. در نتیجه، فراوانی نسبی شان، به تدریج افزایش می یابد و اغلب افراد جمعیت را همین باکتری های مقاوم تشکیل می دهند.

در حال حاضر داروهایی که به طور معمول برای درمان بیماریهای ناشی از گونه های سودوموناس، مورد استفاده قرار می گیرند، از خانواده ی داروهای بتالاکتام می باشند که از طریق "مهار سنتز دیواره ی سلولی" عمل می نمایند:

چنان که می دانیم، دیواره ی سلولی باکتری ها، به عنوان یک لایه ی مستحکم، علاوه بر تعیین شکل میکروارگانیسم، از سلول باکتری در مقابل فشار اسموتیک بالای آن محافظت می کند. آسیب به دیواره ی سلول چه از طریق تاثیر آنزیم های لیزوزومی و چه از طریق مهار تولید آن توسط دارو، به متلاشی شدن آن خواهد انجامید.

این دیواره از یک پلیمر پپتیدوگلیکان (مورین) پیچیده و دارای پیوند متقاطع تشکیل شده است. این پلی ساکارید حاوی قندهای N – استیل گلوکزآمین (NAG) و N – استیل مورامیک اسید (NAM) به شکل یک درمیان می باشد، یک پپتید پنج اسید آمینه ای (پنتاپپتید) نیز، به NAM متصل میباشد. این پپتید به D – آلانین – D – آلانین، ختم می شود. در طول ساخته شدن دیواره سلولی، پروتئین هایی به نام پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) که در واقع گروه بزرگی از آنزیم های کربوکسی پپتیداز و ترانس پپتیداز هستند، با جدا کردن D – آلانین انتهایی،

باعث شرکت دی آلانین ماقبل آخر، در واکنش ایجاد تقاطع عرضی (ترانس پپتیداسیون) می شوند؛ و به این ترتیب، نقش خود را در ساخت دیواره ی سلولی باکتری، ایفا می نمایند. داروهای بتالاکتام، با اتصال به این پروتئین ها (PBPs)، عمل ترانس پپتیداسیون یعنی ایجاد اتصال متقاطع در ساخت دیواره ی سلولی را مهار می کنند؛ در نهایت آنزیمهای اتولیتیک که هیدرولازهای مورین نام دارند، فعال شده و موجب تخریب پپتیدوگلیکان می شوند؛ به این ترتیب سلول با از دست دادن دیواره، در مقابل فشار بالای اسمزی درون خود تاب نیاورده و متلاشی خواهد شد.

ارتباط بین مهار فعالیت PBP ها، و فعال شدن آنزیم های اتولیزین هنوز بدرستی مشخص نیست. ترانس پپتیدازها، عموماً در فضای پری پلاسمی قرار دارند.

داروهای بتا لاکتام در باکتریهای گرم مثبت با انتقال مستقیم و در باکتریهای گرم منفی، یا از طریق کانال های پورین و یا از طریق انتشار ثانویه از غشاء خارجی باکتریها به درون راه یافته و با PBP ها به شکل کووالان واکنش می دهند و در واقع با استیله کردن این آنزیم ها آنها را غیرفعال می سازند.

تعداد PBP ها در باکتریها متفاوت است و هر یک از آنتی بیوتیک های بتالاکتام، به PBP خاصی متصل می شود. به عنوان مثال استافیلوکوک ها، ۴ نوع PBP دارند و اشرشیاکلی حداقل ۷ نوع PBP دارد. در اشرشیاکلی، PBP1a,1b که وزن مولکولی بالایی دارد، درواقع ترانس پپتیدازی است که مسئول ساخت پپتیدوگلیکان می باشد. مهار ترانس پپتیدازها می تواند باعث تشکیل اشکال کروی در این باکتری ها و لیز سریع آنها شود. مهار سایر PBP ها ا جمله PBP-2 ممکن است که با تأخیر بیشتری باعث لیز باکتریها شود و یا اینکه با مهار PBP-3 باکتریها به شکل رشته ای در آیند(۲۴).

فراوان ترین و مهم ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، تولید آنزیم های هیدرولیز کننده بتالاکتام ها می باشد. درواقع این آنزیم ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی بیوتیک های

بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان، و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می شوند. به طور کلی مقاومت به دارو در باکتری ها، به سبب عناصر ژنتیکی و یا ماهیت غیر ژنتیکی اتفاق می افتد.

منشاء غیر ژنتیکی مقاومت:

آنتی بیوتیک هنگامی بر باکتری موثر است که باکتری از لحاظ متابولیکی فعال باشد. باکتری هایی که از لحاظ متابولیکی غیر فعال اند و در حال رشد و نمو نیستند، نسبت به دارو مقاومند. از آنجایی که بیشترین فعالیت متابولیکی باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد آن ها مشاهده می شود، این ارگانیسم ها بیشترین حساسیت خود را به آنتی بیوتیک ها در این فاز نشان می دهند. به عنوان مثال باکتری هایی که به مدت چند سال پس از عفونت در نسوج زنده باقی می مانند، و در عین حال توسط سیستم ایمنی میزبان محدود شده و تکثیر نمی یابند، در مقابل درمان مقاوم بوده و نمی توان آن ها را با دارو ریشه کن کرد. چنان چه این ارگانیسم ها، مثلا به دنبال مهار و تضعیف ایمنی سلولی شروع به تکثیر کنند، به همان داروها حساس خواهند بود (۲۵).

منشاء ژنتیکی مقاومت:

الگوهای ژنتیکی مقاومت دارویی شامل:

- **دارای منشاء کروموزومی:** این امر به صورت موتاسیون خودبه خودی بر روی ژن های کنترل کننده ی حساسیت باکتری روی می دهد. این گونه مقاومت، معمولا بر اساس تغییر در گیرنده های دارو در باکتری عمل می کند.

- **دارای منشاء خارج کروموزومی:** در این حالت فاکتور های مقاومت غالبا" از طریق عناصر سیار ژنتیکی انتقال می یابد. این فاکتورهای مقاومت به طور شاخص از طریق پلاسمیدهای

کنژوگه، که حاوی ژن های مقاومت نسبت به یک یا چند داروی ضد میکروبی هستند، و طی مکانیسم های مختلف از جمله کونژوگاسیون از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می شوند. ژن های موجود بر روی پلاسمیدها، معمولا بر اساس تولید آنزیم های غیر فعال کننده ی دارو عمل می کنند. در سال های اخیر به خوبی مشخص شده است که طیف عمده ای از این الگوهای مقاومت به واسطه کسب سایر عناصر ژنتیکی سیار حاوی ژن های مقاوم نیز ایجاد می شوند ، که به واسطه این پدیده ژن های مقاومت دارویی از طریق انتقال افقی به سایر گونه ها و حتی جنس های دیگر باکتریایی انتقال می یابد. این عناصر سیار ژنتیکی غالبا از جنس ترانسپوزون، فاژ و اینتگرون ها هستند که پتانسیل بالایی برای انتقال ژن های مقاومت دارویی نشان می دهند(۲۶).

اینتگرون ها

مطالعات اخیر حاکی از نقش قابل توجه و مهم اینتگرون ها در انتشار ژن های مقاوم در بخش های مختلف بیمارستانی است ، که غالبا این ژن های مقاومت بر روی کاست های ژنی مشخص قرار دارند که به سبب قابلیت اتصال این کاست ها در مجموعه های اینتگرونی طی فرایند نو ترکیبی اختصاصی در جایگاه (Site Specific Recombination) انتقال ژن های مقاومت صورت می پذیرد. ماهیت اصلی اینتگرون ها به سبب ژن اینتگراز (IntI) می باشد که کد کننده آنزیم ریکامبیناز اختصاصی در جایگاه بوده و مقدمات اتصال یا جدا سازی کاست های ژنی کوچک را در جایگاه اتصال (attI) فراهم می سازد. کاست های ژنی معمولا حاوی یک ژن (غالبا " ژن های مقاومت دارویی) و یک جایگاه محافظت شده به نام Att c بوده که مقدمات شناسایی اینتگراز طی فرایند اتصال و برش را فراهم می سازد ، کاست ها معمولا فاقد پروموتور بوده اما بعد از اتصال به اینتگرون از پروموتور آن جهت بیان ژن های انتقال یافته استفاده می کنند .

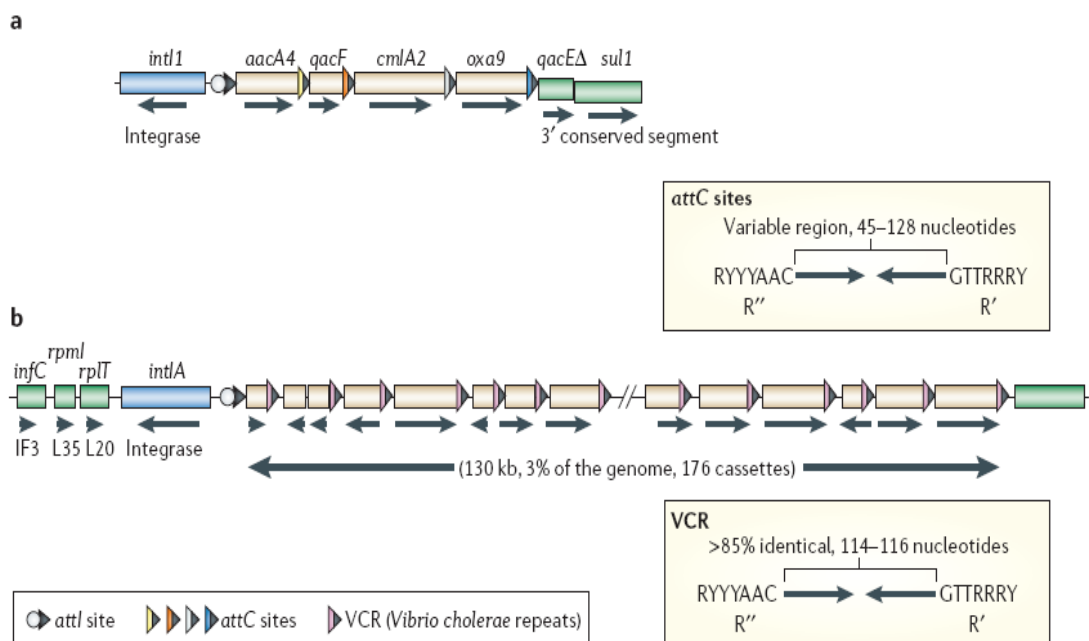


Figure 1 | Mobile integrons and superintegrons. Structural comparison of a 'classical' mobile integron and the superintegron from *Vibrio cholerae* strain N16961. **a** | A schematic representation of the class 1 integron ln40. The various resistance-gene cassettes carry different attC sites. The following antibiotic-resistance cassettes confer resistance to the following compounds: *aacA4*, aminoglycosides; *cmlA2*, chloramphenicol; *oxa9*, β -lactams; *qacF* and *qacE*, quaternary ammonium compounds. The *sul* gene, which confers resistance to sulphonamides, is not a gene cassette. **b** | A schematic representation of the chromosomal superintegron in *V. cholerae*; the open reading frames are separated by highly homologous sequences, the *V. cholerae* repeats (VCRs). *infC*, encodes translation initiation factor IF3; *rplT* and *rplT* encode ribosomal proteins L35 and L20, respectively.

گزارشات مختلف از اقصی نقاط جهان حاکی از حضور اینتگرون ها در طیف وسیعی از از باکتری ها است و تا کنون بیش از ۸ کلاس از آن ها شناسایی شده است. در مطالعاتی که الگوهای ژنتیکی مقاومت دارویی را مورد بررسی قرار دادند کلاس های اینتگرونی ۳ و ۲،۱ (به ویژه اینتگرون کلاس یک) از اهمیت بالایی در انتقال ژن های مقاومت برخوردار بودند. در این مطالعات

ارتباط معنی داری بین حضور این کلاس های اینتگرونی با مقاومت به کلاس های آنتی بیوتیکی عمده مصرفی در بیمارستان ها اثبات شده است (۲۷).

کاست های ژنی که در این اینتگرون ها شناسایی شده است غالباً متغییر بوده به طوری که تاکنون بیش از ۶۰ کاست ژنی متفاوت تا به حال شناسایی شده اند که مقدمات مقاومت به آنتی بیوتیک های مهمی از جمله آمینوگلیکوزیدها ، پنی سیلین ها ، سفالوسپورین ها ، کرباپنم ها ، تریمتوپریم ها ، کلرامفنیکل ، ریفامپین و اریترومایسین و ترکیب های چهار گانه آمونیومی را فراهم می سازد. جالب است که مطالعات زیادی ، اینتگرونها ی حاوی بیش از یک کاست ژنی را گزارش کرده اند که ایزوله های باکتری های حاوی آن ها را مستعد داشتن الگوی مقاومت دارویی چندگانه (Multiple Antibiotic Resistance) می کند (۲۸).

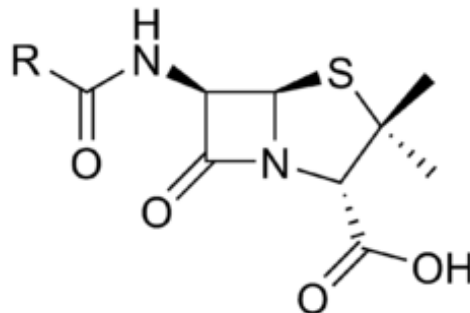
به ویژه در خصوص بتالاکتامازها، وجود ژنهای مقاومت کلاسهای ملکولی A طبقه بندی امبلر(بجز TEM و SHV) و کلاس B و D که مقدمات مقاومت به طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام را فراهم می کنند بر روی کلاس های مختلف اینتگرونی به ویژه اینتگرون کلاس یک اثبات شده است.

بنا به اهمیت داروهای بتالاکتام که به ویژه از نظر اثر بخشی و طیف وسیعی از میکروارگانیسم های بیمارستانی و همچنین اهمیت اینتگرون ها در انتقال کاست های ژنی مقاومت به این داروها ابتدا این داروها به شرح ذیل بحث می شوند.

داروهای بتالاکتام به چهار گروه عمده تقسیم می شوند که عبارتند از:

• **پنی سیلین های طبیعی:** مثل پنی سیلین G و V که از طریق مهار ترانس پپتیداز از سنتز دیواره سلولی در باکتریها ممانعت می کنند. تمامی پنی سیلین ها، دارای یک حلقه تiazolidine متصل به یک حلقه بتالاکتام (که خود دارای یک گروه آمین نوع دوم - RNH می

باشد) هستند. استحکام ساختاری ۶- آمینو پنی سیلانیک اسید، جهت فعالیت بیولوژیک مولکول آن، ضروری است. اگر این حلقه بتالاکتام، توسط بتالاکتام‌های باکتریال تخریب شود، فرآورده حاصل فاقد فعالیت ضدباکتریایی خواهد بود (۱،۲۹).



تصویر ۱-۲ مربوط به هسته ی پنی سیلین

(عضو شاخص خانواده ی بتالاکتام ها) (۱)

- **پنی سیلین های نیمه صناعی:** پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز، پنی سیلین های وسیع الطیف و پنی سیلین های ضد سودوموناس (۱).

- **سفالوسپورین ها و سفامايسين ها:**

این دسته از داروها از بزرگترین خانواده داروهای بتالاکتام و از مشتقات نیمه صناعی ۷- آمینو سفالوسپورانیک می باشند. سفالوسپورین ها نسبت به بسیاری از بتالاکتام‌های باکتریایی، از پنی سیلین پایدارترند، لذا عمدتاً طیف فعالیت گسترده تری دارند. فعالیت ضد میکروبی ذاتی سفالوسپورین های طبیعی، اندک است و اتصال گروههای مختلف R1 و R2، داروهایی با اثرات درمانی خوب و اثرات سمی کم بوجود آورده است.

سفالوسپورین ها از لحاظ مکانیسم عمل شبیه پنی سیلین ها عمل می کنند. درواقع بعد از اتصال به PBP ها با مهار عمل ترانس پپتیداسیون، از سنتز دیواره سلولی باکتریها ممانعت می کنند و سرانجام با فعال شدن آنزیم های اتولیتیک سلول باکتری از بین خواهد رفت. این دسته از داروهای بتالاکتام را براساس طیف اثر بر باکتری های گرم منفی به چهار دسته تقسیم بندی می کنند(۱).

نسل اول سفالوسپورین ها

این دسته از داروها غالباً بر باکتریهای گرم مثبت مؤثرند و اثرشان بر باکتریهای گرم منفی محدود به باکتریهای روده نظیر اشرشیاکلی، کلبسیلا و پروتئوس میرابیلیس می باشند. هرچند این داروها نسبتاً وسیع الطیف و غیرسمی اند ولی به عنوان داروی انتخابی، در درمان هیچ عفونتی به کار نمی روند. از جمله این داروها عبارتند از: سفادروکسیل، سفازولین، سفالکسین، سفالوتین، سفاپیرین، سفادین(۱).

نسل دوم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها برعلیه باکتری های گرم منفی اثر بیشتری داشته و بر روی باکتریهای گرم مثبت اثری مشابه سفالوسپورین های نسل اول دارند؛ نظیر سفاکلور، سفامندول، سفونیسید، سفپروزیل، لوراکایف، سفوروکسیم، سفورانید و سفامایسین ها که شامل سفوکسیتین، ممفتازول و سفوتتان اند؛ که غالباً برعلیه باکتری بی هوازی فعالیت دارند. هرچند که سفالوسپورین های نسل دوم، ممکن است که در شرایط آزمایشگاهی، علیه گونه های انتروباکتر و سیتروباکتر موثر باشند؛ ولی عموماً در درمان عفونت های ایجاد شده علیه این ارگانیسم ها به کار نمی روند. زیرا موتانت های مقاوم این باکتریها با تولید یک بتالاکتاماز کروموزومی، این داروها و همچنین سفالوسپورین های نسل سوم راهیدرولیز می نماید(۱، ۲۹).

نسل سوم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها به علت داشتن گروههای R بزرگ و غیرمعمول، نسبت به عمل بتالاکتامازها، مقاومت شدیدی از خود نشان می دهند. این دسته از داروها، هرچند که بیشترین طیف اثر را بر روی باکتری های گرم منفی دارند، ولی فعالیت شان علیه باکتری های گرم مثبت ناچیز است. این داروها به سبب میل ترکیبی بالا به PBP ها در باکتریها، و همچنین به سبب مقاومت خوبی که در برابر بسیاری از بتالاکتامازها از خود نشان می دهند، داروهای مناسبی هستند. از جمله این داروها عبارتند از: سفوپرازون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتی زوکسیم، سفتریاکسون، سفکسیم، سفپودوکسیم پروگزتیل، سفتی بوتین و موگزالاکتام(۲۹).

نسل چهارم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها، از نظر اثر بر باکتریهای گرم منفی، مشابه نسل سوم بوده و همچنین بر علیه باکتریهای گرم مثبت، فعالیت خوبی از خود نشان می دهند. سفپیم، نمونه ای از سفالوسپورین های نسل چهارم است. این دارو، به دلیل این که نسبت به هیدرولیز بتالاکتامازهای کروموزومی و تا حدی بتالاکتامازهای وسیع الطیف مقاوم است، جزو گروه چهارم قرار می گیرد(۳۰).

کارباپنم ها

این دسته از داروها به طریق صناعی از تینامایسین ساخته می شوند. اگرچه تینامایسین در درمان عفونت های انسانی مورد استفاده قرار نمی گیرد، یکی از مشتقات Formimidoyl آن، یعنی ایمپنم به عنوان یکی از وسیع ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام، مصرف بالینی دارد. کارباپنم ها، ساختمانی دوحلقه ای، شامل یک حلقه بتالاکتام و یک حلقه غیراشباع پنج کربنه دارند، که به جای اتم کربن در موقعیت ۱ آن، اتم گوگرد قرار دارد. ایمپنم با اتصال قوی به PBP-1 و PBP-2 از عمل ترانس پپتیداسیون ممانعت می کند. این داروها در برابر بسیاری از بتالاکتامازها و همچنین بتالاکتامازهای کروموزومی کلاس ۱ (که باعث تخریب سفالوسپورین های

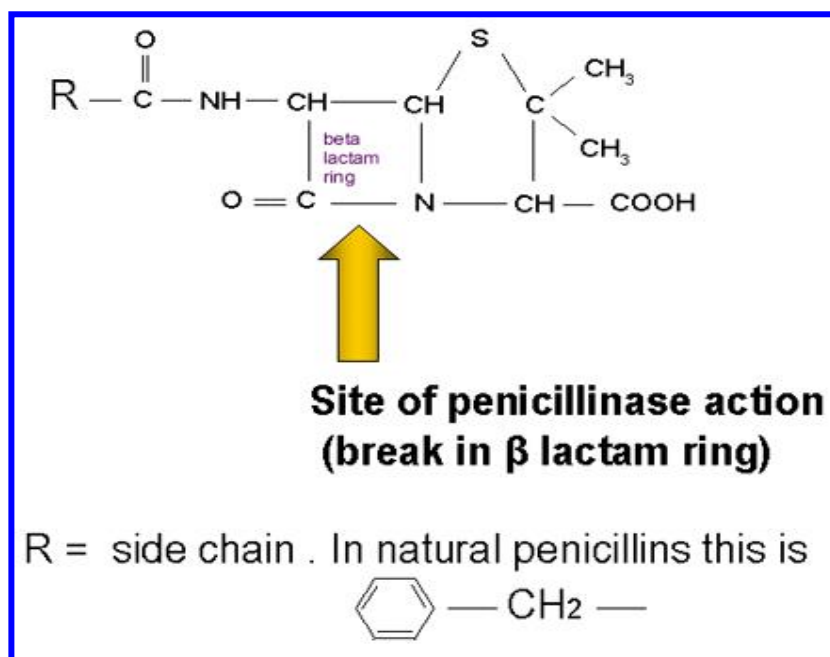
نسل سوم می گردند) مقاوم هستند. ایمنی پنم، به خوبی به سلول های گرم منفی نفوذ کرده و علیه باکتری های بی هوازی نیز موثر است. تجویز ایمنی پنم به همراه سفالوسپورین ها جایز نیست، چرا که این دارو، سبب بیان بتالاکتاماز کروموزومی کلاس ۱ می گردد. تمامی سفالوسپورین ها توسط بتالاکتاماز کلاس ۱ غیرفعال می شوند و اسیدکلولانیک و سولباکتام قادر به غیرفعال کردن بتالاکتاماز کلاس ۱ به تنهایی نیستند. امروزه کرباپنم ها به عنوان داروی انتخابی در درمان بیماران مبتلا به ارگانیسم های تولید کننده ESBL به کار می روند. این داروها در برابر هیدرولیز کنندگی ESBL ها کاملاً پایدار بوده و به علت اندازه مولکولی فشرده و ساختار ژئوترونیک خود به راحتی از غشاء خارجی عبور می کنند. مطالعات نشان داده که درمان با ایمنی پنم در بیماران مبتلا به ارگانیسم های مولد ESBL، پیامدهای بهتری نسبت به سایر داروهای ترکیبی دارد. در مطالعه ای که اخیراً بر روی سوش های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به چند دارو در اسکاتلند انجام شد، تنها یک ایزوله به ایمنی پنم مقاوم بود. که آن هم به علت از دست دادن پروتئین های غشاء خارجی بود. کرباپنم های جدید مانند ارتاپنم و ایمنی پنم در درمان ارگانیسم های تولید کننده ESBL مفید است. مطالعات انجام شده، حاکی از آن است که ارتاپنم ها در شرایط آزمایشگاهی فعالیت خوبی را علیه ارگانیسم های تولید کننده ESBL نشان می دهند، هر چند با ازدست دادن پورین، حساسیت این داروها می تواند کاهش یابد (۲۹، ۳۱).

مونوباکتام ها:

آزترونام مهمترین داروی این خانواده است. این داروها به واسطه داشتن ساختار تک حلقه ای، مشخص می شوند. آزترونام، اولین مونوباکتامي است که در سال ۱۹۹۸ در طب نوزادان توسط USFDA مجوز استفاده را دریافت کرد.

این داروها باعث مهار ساخت دیواره سلولی باکتریها می شوند. مکانیسم عمل این دارو شبیه پنی سیلین و سفالوسپورین بوده و ترجیحاً با اتصال به PBP-3 در باکتریها گرم منفی باعث لیز و

مرگشان خواهد شد. تمایل آزترونام برای PBP در باکتریهای گرم مثبت و بی هوازی بسیار ناچیز است. در مقایسه با ایمی پنم، آزترونام طیف ضد میکروبی محدودی دارد. در مجاورت آزترونام، باکتریهای گرم منفی ابتدا به شکل رشته های طویل درآمده و سپس از میان خواهند رفت. هرچند این داروها در برابر خواص هیدرولیزکنندگی بسیاری از بتالاکتامزهای کروموزومی یا پلاسمیدی مقاومند، ولی مقاومت خود را در برابر بتالاکتامزهای TEM-1, TEM-3, TEM-5 و SHV-2 از دست می دهند(۲۹).



تصویر ۱-۳ محل اثر آنزیم بتالاکتاماز روی حلقه ی بتالاکتام(۱)

چنان که اشاره شد، برخی ژن های ایجاد کننده ی مقاومت، ترکیباتی تولید می کنند که بتالاکتاماز نامیده می شوند و قادر به تجزیه بتالاکتام ها می باشند، و بنابراین، باکتریهای حامل چنین ژن هایی، در حضور آنتی بیوتیک های بتالاکتام از بین نمی روند. به عبارت بهتر، بتالاکتامزها، آنزیم هایی هستند که سبب تخریب حلقه ی بتالاکتام موجود در آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام و هیدرولیز آن ها می شوند. این آنزیم ها منشاء پلاسمیدی داشته و به سبب انتقال

فاکتور مقاومت به سایر گونه ها، حتی دیگر جنس های دخیل در عفونت های بیمارستانی، در سال های اخیر مورد توجه بسیاری بوده اند. به عنوان نمونه از چنین ژن هایی، می توان به ژن های CTX, PER, SHV و TEM اشاره کرد.

نکته این جاست که بروز جهش در این ژن ها، و به دنبال آن جایگزینی اسیدهای آمینه در محصول این ژن ها، به ویژه در جایگاه فعال آن ها، سبب پیدایش بتالاکتمازهایی با طیف اثر وسیع روی انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام، از قبیل پنی سیلین ها و سفالوسپورین های نسل اول، دوم، سوم، چهارم (که دارای زنجیره ی جانبی اکسی ایمینو هستند)، مانند: سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، و سفپیم) و منوباکتام ها (مثل آزترونام) می شود. به چنین بتالاکتمازهایی، بتالاکتمازهای وسیع الطیف (ESBLs)، اطلاق میشود. (۲۹-۳۱)

اصول طبقه بندی بتالاکتمازها:

از سال ۱۹۷۰، چندین معیار، جهت طبقه بندی عملکرد بتالاکتمازها استفاده می شود، از جمله طیف ضد میکروبی، پروفایل سوبسترا، پروفایل مهارکنندگی آنزیم ها، شارژ آنزیم (PI)، میزان هیدرولیزکنندگی (V_{max})، تمایل اتصال (KM)، Isoelectric focusing، وزن مولکولی پروتئین و محتویات اسید آمینه ای آنها (۳۲).

در سال ۱۹۷۳، طرح طبقه بندی بتالاکتمازها برای اولین بار توسط Sykes و Richmond ارائه داده شد، که براساس پروفایل سوبسترا، حساسیت به مهار کننده ها و Isoelectric focusing یکسانی اندازه و خواص ایمونولوژیکی، بتالاکتمازها را به ۵ گروه عمده (I-V) تقسیم کرد. البته این طرح طبقه بندی قبل از پیدایش ESBL ها مطرح شد. بنابراین با طرح این طبقه بندی افتراق بین ESBL ها و آنزیم های والد اولیه شان یعنی TEM-1, TEM-2 و SHV-1 ممکن نبود.

در سال ۱۹۹۵، Bush-Jacoby بتالاکتامازها را براساس پروفایل سوبسترا، پروفایل ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک به ۴ گروه (۱-۴) و زیر گروه (a-f) مطابق جدول ۲ طبقه بندی کردند (۳۲).

- گروه ۱ : شامل سفالوسپورینازهایی هستند که توسط کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. این گروه به کلاس C تعلق دارند.

- گروه ۲: شامل پنی سیلینها و سفالوسپورینازها و یا هر دو می باشند که توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند. این گروه مشابه کلاس A و D مولکولی می باشند، که شامل ژنهای اصلی TEM و SHV هستند، ولی به علت تعدد بتالاکتامازهای مشتق شده از این آنزیم ها، این گروه به ۲ زیر گروه عمده تقسیم می شوند: ۲a و ۲b. زیر گروه ۲a، شامل تمام پنی سیلینها می باشد، در حالی که زیر گروه ۲b بتالاکتامازهای وسیع الطیف را شامل می شوند؛ بدین معنی که آنها قادرند پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را به صورت یکسان هیدرولیز نمایند. به همین دلیل زیر گونه های زیر از زیرگروه 2b مشتق شده اند که عبارتند از:

✓ زیرگروه ۲be: که شامل بتالاکتامازهای وسیع الطیفی (ESBLs) می باشند که قادرند که نسل سوم سفالوسپورین ها (از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفودوکسیم) و همچنین مونوباکتام ها (آزترونام) را غیرفعال سازند.

✓ زیرگروه ۲br: شامل بتالاکتامازهایی با تمایل کمتر به کلاولانیک اسید و سولباکتام می باشند. این آنزیم ها را آنزیم های مشتق شده از TEM و مقاوم به مهارکننده می نامند. هرچند این آنزیم ها هنوز به تازوباکتام ها حساس مانده اند.

✓ زیر گروه ۲C: این آنزیم ها از گروه ۲b جدا شده اند، زیرا کاربنی سیلین ها را بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها غیرفعال می کنند. هرچند اثر یکسانی بر کلوگراسیلین دارند.

✓ زیر گروه ۲d: آنزیم هایی هستند که کلوگراسیلین ها را بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها غیرفعال می سازند، در حالی که اثر یکسانی در برابر کاربنی سیلین ها دارند. این آنزیم ها به طور ضعیفی توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند . برخی از آنها از نوع ESBL ها هستند.

✓ زیر گروه ۲e: سفالوسپورینازهایی هستند که قادرند مونوباکتام ها را نیز هیدرولیز نمایند. این آنزیم ها توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند.

✓ زیر گروه ۲f: این آنزیم ها سفالوسپورینازهای دارای جایگاه فعال سرین هستند در حالی که سفالوسپورینازهای دارای جایگاه فعال روی (Zn) در گروه ۳ قرار می گیرند.

• گروه ۳ شامل بتالاکتامازهای برپایه جایگاه فعال روی می باشند، که مشابه کلاس B مولکولی هستند. این آنزیم ها قادرند که پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها و کرباپنم ها را هیدرولیز نمایند. بنابراین کرباپنم ها توسط هر دو گروه ۲f (مکانیسم بر پایه سرین) و گروه ۳ (مکانیسم بر پایه روی) مهار می شوند.

• گروه ۴ شامل پنی سیلینازهایی هستند که توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند؛ در طبقه بندی مولکولی برای آنها مشابهی نیافته اند (۳۲).

Table 1. Selected β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria.				
β -Lactamase	Examples	Substrates	Inhibition by Clavulanic Acid*	Molecular Class
Broad-spectrum	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzylpenicillin (penicillin G), aminopenicillins (amoxicillin and ampicillin), carboxypenicillins (carbenicillin and ticarcillin), ureidopenicillin (piperacillin), narrow-spectrum cephalosporins (cefazolin, cephalothin, cefamandole, cefuroxime, and others)	+++	A
	OXA family	Substrates of the broad-spectrum group plus cloxacillin, methicillin, and oxacillin	+	D
Expanded-spectrum	TEM family and SHV family	Substrates of the broad-spectrum group plus oxyimino-cephalosporins (cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, and ceftriaxone) and monobactam (aztreonam)	++++	A
	Others (BES-1, GES/IBC family, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1, and VEB-2)	Same as for TEM family and SHV family	++++	A
	CTX-M family	Substrates of the expanded-spectrum group plus, for some enzymes, cefepime	++++	A
AmpC	OXA family	Same as for CTX-M family	+	D
	ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY family, DHA-1, DHA-2, FOX family, LAT family, MIR-1, MOX-1, and MOX-2	Substrates of expanded-spectrum group plus cephamycins (cefotetan, ceftioxin, and others)	0	C
Carbapenemase	IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	Substrates of the expanded-spectrum group plus cephamycins and carbapenems (ertapenem, imipenem, and meropenem)	0	B
	KPC-1, KPC-2, and KPC-3	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	+++	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, and OXA-48	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	+	D

* Plus signs denote relative sensitivity to inhibition.

جدول ۱-۱: طبقه بندی بتالاکتامازها (۳۲)

اما ارتباطات اساسی آنزیم های بتالاکتام به بهترین نحو در طبقه بندی Ambler آمده است، که بر پایه تشابه توالی اسید آمینه ها، به جای خواص فنوتیپی (در سیستم طبقه بندی Bush-Jacoby پایه ریزی شده اند.

مطابق طبقه بندی Ambler، بتالاکتامازها در چهار کلاس مولکولی تکاملی مجزا، با سکانس موتایفی جداگانه برای هر کدام طبقه بندی شده اند. کلاس های A، C و D دارای اسید آمینه سرین در جایگاه فعال خود هستند و این در حالی است که کلاس B یا متالوبتالاکتامازها برای

فعالیت به روی وابسته اند. اکثر ESBL ها به کلاس مولکولی A و D، در طبقه بندی Ambler، تعلق دارند که به واسطه داشتن جایگاه فعال سرین مشخص می شوند. ESBL های مشتق از SHV و TEM به آنزیم های کلاس A تعلق داشته و این در حالی است که ESBL های مشتق از OXA به کلاس مولکولی D (اگزاسیلینازها) تعلق دارند (۳۳، ۳۴).

چنان که گفته شد، آنزیم های بتالاکتاماز، طبق طبقه بندی Ambler به ۴ گروه اصلی B, C, A و D تقسیم می شوند:

گروه A، که سبب هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورین های طیف باریک می شوند، شامل TEM-1، TEM-2 و SHV-1 بوده و غالباً در باکتری هایی مانند اشرشیاکلی، و کلبسیلا پنومونیه شناسایی شده اند (۳۵-۴۲).

همانطور که در جدول ۱-۵ آمده است، بخش عمده ای از ژنهای کد کننده بتالاکتامازهای این گروه ماهیت اینتگرونی داشته و توسط این عناصر سیار ژنتیکی انتقال می یابند.

جدول ۱-۲: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی A با منشا اینتگرون (۵۰)

Table 1
Ambler class A, integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
VEB-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vietnam	[9]
	<i>Escherichia coli</i>	Vietnam	[9]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[12]
	<i>Citrobacter freundii</i>	Thailand	[13]
VEB-1a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait	[14]
VEB-1b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait	[14]
VEB-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thailand	[15]
GES-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	French Guiana	[18]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[56]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	Portugal	[60]
GES-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa	[10,11]
IBC-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Greece	[16]
IBC-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece	[17]
CTX-M-2	<i>Salmonella enterica</i>	Argentina	[19]
	<i>Proteus mirabilis</i>	Argentina	[20]
CTX-M-9	<i>Escherichia coli</i>	Spain	[21]
PSE-1	<i>Vibrio cholerae</i>	Thailand	[22]

All genes listed were found on class 1 integron structures with notable exceptions.

گروه B، شامل متالوبتالاکتامازهای (MBLs) وابسته به روی (Zn) می باشند که قادر به هیدرولیز کارباپنم ها بوده و در باکتری هایی مانند سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده اند. اکثر ژنهای کد کننده این آنزیم ها نیز ماهیت اینتگرونی داشته و توسط آنها انتقال می یابند. بخشی از ژنهای بتالاکتامازی گروه B با منشا اینتگرونی در جدول ۱-۳ آمده است (۴۳).

جدول ۱-۳: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی B با منشا اینتگرون (۵۰)

Ambler class B, integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i> ^a	Japan	[23–25]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	[44,45]
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy	[26]
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japan	[47,48]
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	[8]
	<i>Citrobacter youngae</i>	China	[49]
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	[50]
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canada	[7,51]
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	[27]
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy	[28]
VIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy	[7]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	[46]
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Italy	[29]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece	[52]
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[53,54]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	[55]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Spain	[56]

All genes listed were found on class 1 integron structures with notable exceptions.

گروه C، که از آنها می توان، AmpC بتالاکتامازها را نام برد، قادر به تجزیه ی سفومایسین ها و سفالوسپورین ها می باشند (۴۴).

و گروه D، بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز زیاد، مانند OXA، که علیه اگزاسیلین و کلوزاسیلین بوده و اسید کلاولانیک به طور ضعیف، از فعالیت آن ها جلوگیری می کند. بخشی از

بتالاكتامازهای مربوط به این کلاس همانطور که در جدول 1-4 آمده است ماهیت اینتگرونی دارند (۴۵-۴۹).

جدول ۱-4: ژن های بتالاكتامازی کلاس D با منشا اینتگرون (۵۰)

Ambler class D, class 1 integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
OXA-1	<i>Salmonella enterica</i>	Italy	[32]
OXA-5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa	[10,11]
OXA-9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	France	[33]
OXA-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vietnam	[9]
OXA-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[30]
OXA-20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[57]
OXA-28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[31]
OXA-30	<i>Escherichia coli</i>	France	[59]

تعریف آمینوگلیکوزیدها

این دسته از داروها سنتز پروتئین در باکتریها را مهار می کنند. استرپتومایسین، نئومایسین، کانامایسین، آمیکاسین، جنتامایسین و ... از مهمترین داروهای این مجموعه می باشند. این داروها از طریق مهار زیر واحد ۳۰S ریبوزومی عمل می کنند.

بروز مقاومت دارویی نسبت به این داروها عمدتاً از طریق روش های زیر صورت می پذیرد:

۱) کاهش تمایل در گیرنده ریبوزومی

۲) کاهش نفوذپذیری در برابر دارو و فقدان انتقال فعال به درون سلول

۳) تخریب آنزیمی دارو که شایعترین مکانیسم مقاومت به این داروها محسوب می شود. تا به امروز بیش از ۵۰ آنزیم مختلف شناسایی شده است. ژنهای کد کننده این آنزیم ها به طور معمول بر روی پلاسمیدها و سایر عناصر سیار ژنتیکی از جمله اینتگرون ها و ترانسپوزون ها قرار دارند(۵۱).

مکانیسم های مقاومت به فلوروکینولونها:

فلوروکینولون ها در اوایل دهه ۱۹۷۰ عرضه شدند . در ابتدا این عوامل بیشتر جهت درمان عفونتهای ادراری مورد استفاده قرار می گرفتند. ولی بعد از آن کم کم استفاده از این عوامل ضد میکروبی وسیع تر گشت به شکلی که امروزه در درمان اکثر عفونت های مختلف از این عوامل استفاده می شود. استفاده از این عوامل در دهه ۱۹۸۰ بسیار زیاد گردید به شکلی که میزان استفاده از آن در مقایسه با سایر داروهای دیگر به مقدار قابل ملاحظه ای پیش گرفت. در اواخر همین دهه بود که اولین موارد مقاومت نسبت به این داروها گزارش گردید. در اوایل این مقاومت میزان بسیار پایینی را شامل می شد. ولی بعدها با استفاده بیشتر از این عوامل داروهای و استفاده گسترده در درمانهای مختلف میزان مقاومت با سرعت بسیار زیادتری نسبت به قبل رو به افزایش نهاد(۵۲).

عموماً مقاومت نسبت به فلوروکینولونها در چند مکانیسم خلاصه می شود که مهمترین آنها موتاسیون های ایجاد شده در آنزیم های هدف فلوروکینولونها شامل آنزیم های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است. همچنین مهار تجمع و کاهش غلظت دارو در باکتریها از دیگر مکانیسم های کاهش حساسیت و ایجاد مقاومت در باکتریهای مختلف می باشد. از آنجایی که ظهور فلوروکینولونهای جدید بیشتر در درمان عفونتهای دستگاه ادراری و بیشتر عفونتهای تنفسی می باشد در نتیجه مقاومت باکتریهای ایجاد کننده این عفونتها به این عوامل ضد باکتریایی جای

نگرانی بسیار دارد.(۴۰) به شکلی که مطالعات اخیر در سالهای گذشته مقاومت نسبتاً بالایی را در نقاط مختلف دنیا نشان داده است. در حال حاضر نوعی دیگر از مقاومت به این داروها بواسطه شیوع ژن پلاسمیدی qnr گزارش می شود. این ژن ها در غالب یک پلاسمید گانژوگاتیو انتقال یافته و باعث ایجاد مقاومت نسبت به کینولونها می باشد(۵۳-۵۵).

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش مراقبت ویژه (ICU)

بر اساس نتایج مطالعات مختلف در سراسر جهان مقاومت های ضد میکروبی در بیماران بستری در بخش ICU از اهمیت ویژه ای برخوردارند. این امر، عمدتاً به دنبال درمان ناکامل با آنتی بیوتیک هاست، که غالباً مقاومت های ضد میکروبی را به همراه دارد. بستری طولانی مدت در بیمارستان و نقایص درمانی آنتی بیوتیکی دوران نقاهت نیز، از عوامل اصلی افزایش الگوی مقاومت دارویی در بخش های مراقبت ویژه هستند. بیماران بستری در بخش ICU، به سبب راهکارهای تشخیصی-درمانی سریع و تهاجمی که برایشان در نظر گرفته می شود و با توجه به اینکه غالب بیماران بستری در این بخش سیستم ایمنی تضعیف شده داشته و یا از بیماری های شدید و مزمن رنج می برند، بیشتر مستعد ابتلاء به عفونت با ارگانیسم های مقاوم و کلونیز با آن هستند. فشار انتخابی استفاده از داروهای وسیع الطیف و شلوغی بیش از حد در این بخش از دیگر عوامل مهم و مشکل زا در ارائه راهکارهای صحیح کنترل عفونت محسوب می شوند. مطالعات فراوانی که بر روی ایزوله های جدا شده از بخش ICU انجام شد، نشان داد که ارتباط بسیار نزدیکی، بین استفاده قبلی از داروهای ضد میکروبی و متعاقباً مقاومت های آنتی بیوتیکی وجود دارد.

امروزه، مشکل باکتری می ناشی از سویه های مقاوم به دارو، در بخش های مختلف بیمارستان، به خصوص بخش مراقبت ویژه به طرز شگفت آوری رو به افزایش است. اکثر مطالعاتی که بر روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم انجام شد، نشان می دهند که میزان ارگانیسم های

مقاوم جدا شده از بخش ICU بیشتر از سایر بخش ها می باشد. در مجموع برای غلبه بر این مشکل، لزوم دقت و توسعه داروهای ضد میکروبی جدید و به کارگیری ابزارهای جدید و گسترده کنترل عفونت کاملاً ضروری به نظر می رسد(۵۶).

اهمیت بالینی جداسازی اینتگرون ها :

امروزه باسیل های گرم منفی دارای اینتگرون باعث نگرانی های جدی برای پزشکان و متخصصان عفونی و کنترل عفونت شده اند. نقش این عناصر در بروز ماهیت مقاومت دارویی چندگانه و مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها به ویژه آنتی بیوتیک های مصرفی در بیمارستان ها باعث مشکل شدن راهکارهای صحیح درمانی و ابزارهای کنترل عفونت شده اند. مطالعات مختلف نشان داده اند که بیماران آلوده به این ارگانسیم ها به طور معنی داری در مرگ و میر بیماران نقش دارند. لذا پزشکان بالینی باید با اهمیت این آنزیم ها از لحاظ بالینی آشنا بوده و راهکارهای لازم برای برخورد با این مشکل، و چگونگی کنترل این عفونت ها را بدانند(۵۷-۵۹).

فاکتورهای خطر در انتشار اینتگرون ها :

فشار انتخابی و استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی، به عنوان یک فاکتور مهم در پیدایش مقاومت های دارویی، به ویژه در بخش ICU مطرح اند. مطالعات متعددی که در این زمینه انجام شد ارتباط نزدیک بین استفاده قبلی از آنتی بیوتیک ها و متعاقب آن، پیدایش مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری های گرم منفی را آشکار کرد. بستری طولانی مدت در بیمارستان، راهکارهای تهاجمی که برای بیماران بستری در این بخش در نظر گرفته می شود (نظیر لوله تراشه، کاتترهای داخل عروقی و کاتترهای ادراری)، و مواجه شدن با بیماران آلوده به ارگانسیم های دارای اینتگرون ، از دیگر عوامل ایجاد خطر در بخش ICU هستند. همچنین بیمارانی که شرایط درمانی بلندمدت برای آنها در نظر گرفته می شود، منبع خوبی برای ورود باکتری های مقاوم به بخش ICU هستند.

پیگیری نکردن بیمارانی که قبلاً در چنین بخش هایی بستری بوده اند و یا کلونیز شده اند، نیز از دیگر مهمترین فاکتورهای خطر محسوب می شوند (۶۰).

روش های کنترل عفونت

محدود نمودن استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، معمول ترین راه کنترل شیوع ارگانیسم های دارای اینتگرون است. آلودگی زدائی محیطی، جداسازی و ایزوله کردن این بیماران، الگوی مصرف صحیح استفاده از آنتی بیوتیک ها، آلودگی زدائی بدن، استفاده از اسپری های بینی-پوودین، سازماندهی کارمندان بخش و در موارد بحرانی، تعطیلی موقت بخش، در کنترل عفونت های ناشی از ارگانیسم های دارای اینتگرون، بسیار کمک کننده اند. همچنین ایجاد پروتوکل و راهنمای استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها، استفاده از داروهایی با طیف اثر محدودتر و قدیمی تر، مشورت با متخصصین بیماری های عفونی و استفاده از برنامه های چرخشی آنتی بیوتیک ها و تغییر آن، استفاده از دستکش و گان، پرهیز از خود درمانی خصوصاً با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بتالاکتام و بالاخره ایجاد یک سیاست علمی محدود سازی استفاده از آنتی بیوتیک ها در کشور، از راهکارهای مهم کنترل عفونت، خصوصاً در بخش های مختلف بیمارستان ها به حساب می آید. در صورت امکان، بستری بیماران در بخش خصوصی و ترخیص زود هنگام آنها و محدود نمودن حرکت یا جابه جایی آنها جز در موارد ضروری و دور ریختن زباله های بالینی، داخل کیسه های مجزا برای دفع مناسب و سوزاندن آنها، از دیگر راهکارهای کنترل عفونت محسوب می شوند (۱۰).

اهداف مطالعه

هدف اصلی:

تعیین فراوانی بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ TEM در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای

جدا شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران

اهداف فرعی:

- تعیین فراوانی ژن TEM در گونه های سودوموناس آئروژینوزای ESBLs مثبت
- تعیین فراوانی ژن TEM برحسب سن بیماران مورد مطالعه
- تعیین فراوانی ژن TEM برحسب جنس بیماران مورد مطالعه
- تعیین فراوانی ژن TEM برحسب بخش بستری بیماران مورد مطالعه
- تعیین فراوانی ژن TEM برحسب نوع نمونه بالینی جمع آوری شده از بیماران مورد

مطالعه

اهداف کاربردی:

این مطالعه ضمن شناسایی حضور ژن TEM در گونه های سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده از بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران به بررسی ارتباط حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی نسبت به داروهای عمده مصرفی در بیمارستان های مورد مطالعه می پردازد. به لحاظ ماهیت سیار بودن این عناصر ژنتیکی نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در کنترل و جلوگیری از انتشار بیشتر فاکتور مقاومت در بین ایزوله های بیمارستانی سودوموناس آئروژینوزا و سایر ایزوله های بالینی موثر باشد.

فرضیات یا سوالات پژوهشی:

۱- آیا ژن SHV در سودوموناس *آئروژینوزای* تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از

فراوانی بالایی برخوردار است؟

بررسی متون:

در مطالعه ای که توسط Shahcheraghi و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی ۴۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده ESBLs در کرمان انجام شد مشخص گردید که یک ایزوله ($2/43$) دارای ژن bla_{CTX-M} , تمام ایزوله ها (100%) دارای ژن bla_{VEB-1} , ۲۸ ایزوله ($68/3\%$) دارای bla_{PER-1} , $24/4\%$ دارای ژن bla_{GES-1} , ۲۹ ایزوله ($70/7\%$) دارای ژن bla_{OXA-1} , ۷ ایزوله ($17/1\%$) دارای ژن bla_{OXA-4} و ۳۸ ایزوله ($92/7\%$) دارای ژن bla_{OXA-10} بودند (۶۱).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Chen و همکارانش در چین انجام شد با بررسی بر روی ۷۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس یک و ارتباط آن با الگوهای مختلف مقاومت دارویی مشخص شد که در مجموع 38% از ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در ادامه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون در ایزوله های مورد مطالعه و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، جنتامایسین، سفپیم، توبرامایسین، آمیکاسین، لووفلوکساسین و سیپروفلوکساسین وجود داشت (۶۲).

در مطالعه ی دیگری که توسط GU و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در چین بر روی ۹۸ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد در مجموع ۴۰ ایزوله ($40/8\%$) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند که با بررسی بیشتر الگوی مقاومت دارویی در دو گروه حاوی و فاقد اینتگرون کلاس یک مشخص گردید که اختلاف معنی داری مابین حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی به ویژه نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید، بتالاکتام و کینولون مشاهده شد. به طوری که ایزوله ای دارای اینتگرون به طور معنی داری نسبت به آنتی بیوتیک های پیراسیلین، پیراسیلین-تازوباکتام، سفتازیدیم، سفپیم، آزترونام، ایمپنم، جنتامایسین، آمیکاسین و لووفلوکساسین مقاومت بالاتری نشان دادند (۶۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Poonsuk و همکارانش بر روی ۱۰۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا و ۱۷۶ ایزوله اسینتوباکتر بومانی در تایلند انجام شد، مشخص شد که ۶۹/۳٪ درصد از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا و ۳۱/۸٪ از ایزوله های اسینتوباکتر بومانی از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در این مطالعه اینتگرون کلاس های دو و سه جداسازی نشد (۶۴).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Fonseca و همکارانش بر روی ۱۰۱ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا در برزیل انجام شد مشخص شد که ۴۴ ایزوله (۴۱/۵٪) درصد از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۵).

در مطالعه ای که توسط Peymani و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی یکی دیگر از باکتری های گرم منفی دخیل در عفونت های بالینی - اسینتوباکتر بومانی - انجام شد در مجموع مشخص شد که ۸۰ درصد از ایزوله ها الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) را نشان دادند که ۹۲/۵ درصد از آنها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در ادامه مشخص شد که ایزوله ای دارای اینتگرون به طور معنی داری نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید ها، کینولون ها، داروهای بتالاکتام مقاومت بالاتری نشان دادند. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و سفپودوکسیم مشاهده نشد زیرا تمامی ایزوله ها به این دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند (۶۶).

جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

جمعیت مورد مطالعه عبارتست از ایزوله های باکتریایی جدا شده از نمونه های بیولوژیک ارسالی (نظیر: خلط، مایع آسیت، ادرار، مایع نخاع، محل زخم و ...) به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستانهای شهرهای قزوین و تهران است.

جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده می شود. با در نظر گرفتن $\alpha=0/05$ ، شیوع گونه های مقاوم در بین نمونه های جدا شده سودوموناس آئروژینوزا $P=0/45$ و دقت $0/08$ تعداد ۱۴۷ نمونه مثبت سودوموناس آئروژینوزا در نظر گرفته میشود. ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جدا سازی شده جهت انجام مراحل تحقیق در فریزر 70°C نگهداری خواهد شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل موارد زیر است :

۱- نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های سودوموناس آئروژینوزا مثبت باشد.

و معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

۱- نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آنها سایر باکتری های بجز سودوموناس آئروژینوزا باشد.

۲- بیمارانی که نمونه های ارسالی آنان تکراری باشد.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1-P)}{d^2} = 148$$

نمونه برداری:

تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی از نظر عفونت با سودوموناس آئروژینوزا ، از بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران از خرداد ماه سال ۹۰ تا خرداد ماه ۹۱ جمع آوری گردید. ایزوله های باکتریایی از نمونه های بالینی از جمله خون، ادرار و کاتترهای ادراری، تراشه، خلط و سایر نمونه های بالینی جمع آوری شدند. ایزوله های جداسازی شده در آزمایشگاه های بیمارستان های بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و EMB پاساژ داده شده و به گروه میکرب شناسی و مرکز تحقیقاتی سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 35°C ، توسط آزمایش های بیوشیمیایی مربوط به شناسایی سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفتند. تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی این ارگانیسم، مورد استفاده قرار گرفتند، عبارتند از:

۱. کشت بر روی محیط مک کانگی آگار
 ۲. رنگ آمیزی گرم
 ۳. انجام آزمون اکسیداز
 ۴. کشت بر روی محیط کلیگر ایرون آگار (KIA)
 ۵. کشت بر روی محیط ستریمیدآگار
 ۶. آزمون اکسیداسیون/فرمنتاسیون (کشت بر روی محیط O/F)
 ۷. رشد در دمای 42°C درجه سانتی گراد
 ۸. آزمون بررسی تحرک (کشت بر روی محیط SIM)
 ۹. آزمایش سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)(۶۷)
- بعد از انجام تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگهداری طولانی مدت باکتریها، ابتدا آنها را در ویال های حاوی محیط کشت تریپتی کیز سوی براث (TSB Broth) کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت

انکوباسیون در دمای 35°C ، در صورت رشد باکتری، یک یا دو قطره گلیسرول ۲۰٪ استریل به آن اضافه کرده و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Agar Diffusion

برای انجام آزمون از دستورالعمل موسسه بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد و به شرح ذیل انجام شد (۶۸).

۱- ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C انکوبه شدند.

۲- در مرحله بعد، ظروف حاوی دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین، آمیکاسین، آموکسی سیلین / کلاولانیک اسید، پیراسیلین/تازوباکتام، تیکارسیلین/کلاولانیک اسید، سفپیم، سفتریاکسون، سفنازیدیم، ایمی پنم، مروپنم، سیپروفلوکساسین و تری متوپریم- سولفومتوکسازول برای انجام آزمون، از فریزر 20°C - (نگهداری بلند مدت) به یخچال 4°C (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳- در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد، استفاده می شود، لذا نمونه ها یک روز قبل از انجام آزمایش، بر روی محیط ژلوز ساده کشت داده شدند. سپس در دمای 35°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزانی از کلونی را به لوله حاوی ۲ ml سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و بعد از مخلوط کردن با

میکسر، سوسپانسیونی به دست آمد که غلظت باکتری در آن، برابر با غلظت نیم مک فارلند بود.

۴- با استفاده از یک سوآپ کتان استریل سوسپانسیون را بر روی محیط مولر هینتون آگار تهیه شده به روش چمنی پخش کردیم. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی فوق الذکر را که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۱ cm از یکدیگر قرار دادیم.

۵- پس از دیسک گذاری، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده یادداشت شدند.

در این آزمون از سویه کنترل *E.coli* ATCC 25922 جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید.

بررسی ملکولی شیوع اینتگرون کلاس یک

برای تعیین شیوع اینتگرون کلاس یک از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده می کنیم. در این روش از پرایمر مخصوص ژن داخلی اینتگرون کلاس یک استفاده شد که با تکثیر ژن مورد نظر و نهایتاً الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز حضور و یا عدم حضور آن مشخص خواهد شد.

استخراج DNA

مراحل استخراج DNA از سویه های تولید کننده ESBL با استفاده از روش Boiling به شرح زیر انجام شد:

۱. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ ml حاوی ۲۰۰ μ l آب مقطر استریل حل می کنیم.
۲. با استفاده از شیکر، آنقدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شود.
۳. ویال ها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، داخل بن ماری جوش (100°C)، قرار می دهیم؛ به طوری که سطح آب جوش، دوسوم ویال را در برگیرد.
۴. در این مرحله، ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰، سانتریفوژ می کنیم. که البته در این مرحله از سانتریفوژ اپندورف استفاده کردیم.
۵. محلول رویی (سوپرناتانت) ویالها، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.
۶. در این مرحله پس از انجام استخراج، برای اطمینان از وجود DNA توتال، از دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

آماده سازی پرایمرها:

۱. ابتدا توالی پرایمرها جهت ساخت تحویل شرکت دانمارکی شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره برطبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.
۲. توالی پرایمرها به شرح ذیل استفاده شد:
 F: 5-ACT GCC TTT TTG CGC CAG AT -3
 R: 5-CAG TTC CGT TTC CCA GCG GT -3
۳. در مرحله بعد، ویالهای حاوی پرایمر، به مدت ۰/۵ ساعت، در دمای 37°C قرار گرفتند.
۴. در این مرحله محلول استوک $100\mu\text{mol}$ تهیه و سپس در دمای 20°C نگهداری شدند.

۵. بسته به کار روزانه برای تهیه محلول کار پرایمرهای با غلظت $10 \mu\text{mol}$ از هر دو رشته

ژن تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

انجام آزمون PCR

در این مرحله ابتدا Maternix تهیه شد (جدول ۱-۳). سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و شناسایی ژن ژن TEM صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR، حجم نهایی هر واکنش، ۲۵ میکرولیتری بود. برای به دست آوردن بهترین مقدار از ترکیبات مورد استفاده (مثل MgCl_2)، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات، طی چند واکنش مختلف PCR انجام شد.

جدول ۱-۳ مقادیر بهینه برای تهیه master mix یک واکنش PCR

حجم (میکرولیتر)	ترکیب
۲	DNTP mix 10 mmol
۱۰	PCR Buffer 10 X
۳	MgCl_2 50 mmol
۷۳	D.H ₂ O

آماده سازی واکنش PCR :

با در نظر گرفتن حجم نهایی هر واکنش PCR که ۲۵ میکرولیتر بود، حجم پرایمرها، DNA الگو و آنزیم پلی مراز که باید به master mix اضافه شوند به شرح ذیل در جدول ۲-۳ آمده است.

جدول ۳-۲: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
Master mix	۲۲
DNA Template	۱
Primer F	1
Primer R	1
Taq pol 5 u/ μ l	0/25

برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler):

پس از قرار دادن ویال ها در دستگاه ترموسایکلر، شرایط دمایی مختلف و زمان های آن ها در یک

واکنش PCR برای ژنوتیپ PER-1، برطبق جدول زیر اجرا گردید.

جدول ۳-۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در یک واکنش PCR

زمان	دما(سانتی گراد)	
5 min	۹۵	First denaturation
1 min	۹۵	Cycle(30)
۳۰ sec	۵۵	
1 min	۷۲	
10 min	۷۲	Final extention

الکتروفورز محصولات PCR

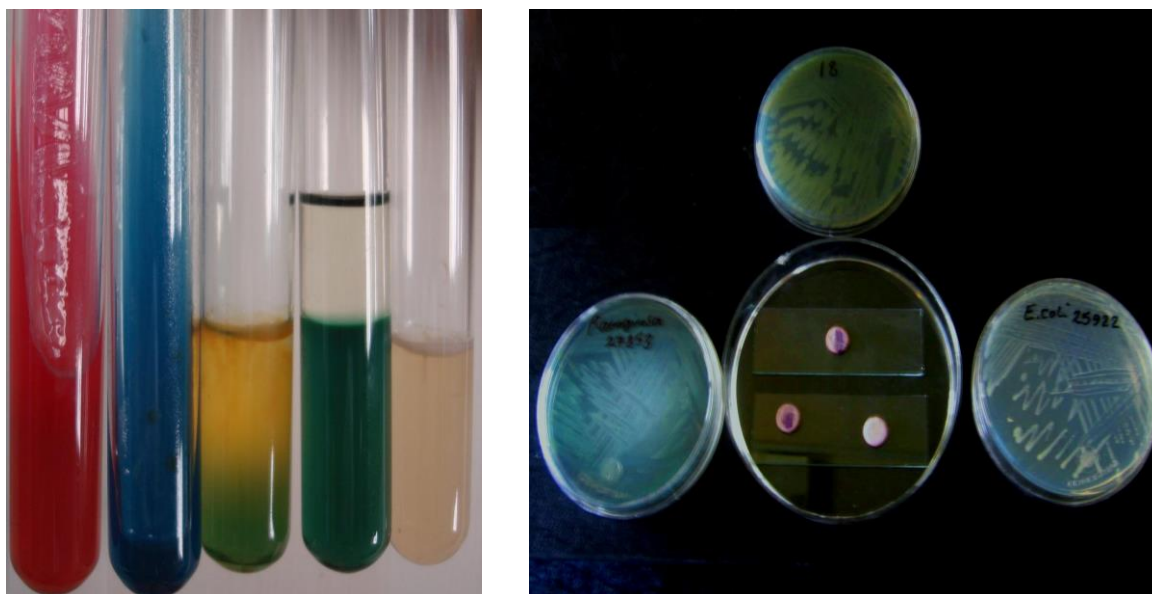
برای انجام الکتروفورز، روی محصولات حاصل از PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. میزان ۱gr پودر آگارز را در ۱۰۰ cc بافر TBE 1X، حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان 1 میکرولیتر (10 µg/ml) سایبرگرین (برای رنگ آمیزی قطعات DNA) به آن اضافه کردیم. پس از مخلوط کردن، محلول را داخل قالب ریخته و پس از بسته شدن ژل، آن را از قالب

خارج و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۳ میکرولیتر 6 X loading Buffer مخلوط کرده و در داخل چاهک های ژل برای الکتروفورز قرار دادیم. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ روی ۱۰۰ ولت، تنظیم گردید، وقتی نمونه، سه چهارم طول ژل را طی کرد، ژل از تانک خارج و با لامپ UV مشاهده شد. در صورت مناسب بودن باندهای حاصل از الکتروفورز، ژل را با دستگاه UVP مورد مشاهده قرار داده و از تصویر ژل مربوطه عکس تهیه کردیم.

کنترل کیفی

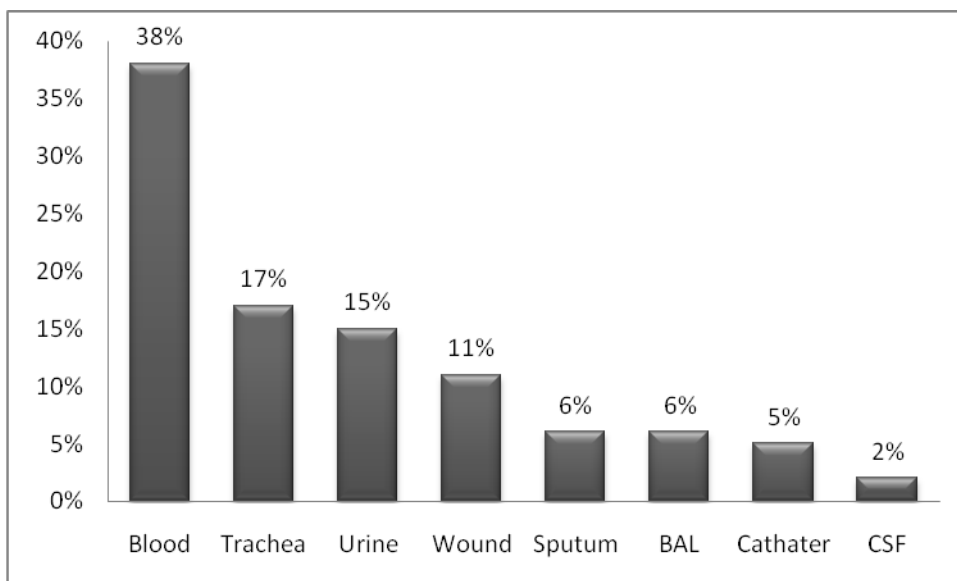
برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از سویه کنترل اسینتوباکتر بومانی تأیید شده حاوی اینتگرون کلاس یک به عنوان کنترل مثبت و اشرشیاکلی ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین برای کنترل انجام آزمون از میکروتیوب های حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه ۱۴۷ ایزوله از گونه های سودوموناس آئروژینوزا پس از انجام تست های استاندارد آزمایشگاهی و میکرب شناسی جمع آوری شدند (تصویر ۳-۱). در انجام آزمون اکسیداز از سویه های استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (کنترل مثبت) و *E. coli* ATCC 25922 (کنترل منفی) استفاده شد (تصویر ۴-۱).



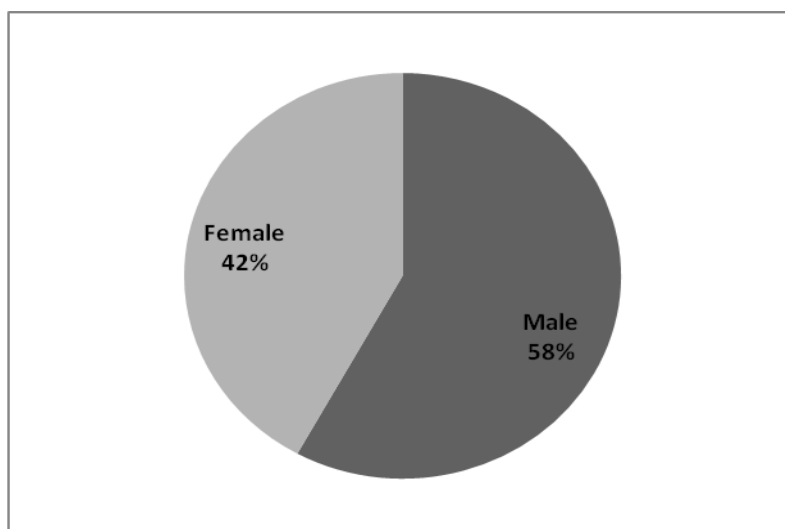
تصویر ۴-۱: سمت راست: نتیجه آزمون اکسیداز، سمت چپ: نتیجه تست های فنوتیپی تعیین هویت (از چپ به راست: قلیا/قلیا در محیط TSI، سیترات مثبت، اکسیداسیون گلوکز مثبت و قرمانتاسیون منفی در محیط O/F، تحرک مثبت و اندول منفی در محیط SIM)

از این بیماران در مجموع ۳۰ ایزوله از نمونه خون، ۱۷ ایزوله از نمونه تراشه، ۱۵ نمونه از ادرار، ۱۱ ایزوله از نمونه زخم، ۶ ایزوله از نمونه خلط و ۶ ایزوله برونکو آلوئولار لاواژ، ۵ ایزوله از کاتتر و ۲ نمونه از مایع مغزی-نخاعی جمع آوری شدند. نمودار ۴-۲ فراوانی سودوموناس آئروژینوزا را در برحسب منبع و نوع نمونه های بالینی ارسالی مراکز مورد مطالعه را نشان می دهد.



نمودار ۴-۲: فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر حسب نمونه های بالینی

در ادامه با بررسی اطلاعات بیماران مشخص شد که 58% از بیماران از جنس مرد و 42% بیماران از جنس زن بودند.



نمودار ۴-۳: فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر حسب جنس

با بررسی میانگین سنی بیماران مشخص شد که بیماران هدف در این مطالعه در محدوده سنی ۱۶ تا ۹۰ سال قرار داشتند که میانگین سنی آنها 52 ± 19.1 تعیین شد (نمودار ۴-۳).

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

با انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش DAD مشخص گردید که ۶۲ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند و به کلاسهای آنتی بیوتیکی بتالاکتام ، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاومت دارویی کامل یا حد واسط نشان دادند. از این تعداد ۱۶ ایزوله (۲۶٪) به ایمی پنم مقاومت کامل، ۱۲ ایزوله (۱۹٪) مقاومت متوسط و ۳۴ ایزوله (۵۵٪) حساسیت نشان دادند. همچنین مشخص شد که از بین ارگانیسیم های با مقاومت دارویی چندگانه، ۱۴ ایزوله (۲۳٪) به مروپنم مقاومت کامل، ۱۳ ایزوله (۲۱٪) مقاومت متوسط و ۳۵ ایزوله (۵۶/۵٪) حساسیت نشان دادند.

شناسایی ملکولی ژن TEM

با انجام آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن TEM بر روی ۱۴۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مشخص شد که در مجموع ۵۲ ایزوله (۳۵/۳۷٪) دارای ژن TEM بودند.



تصویر ۴-۲: حضور ژن TEM در آزمون PCR

جدول ۴-۱: حضور ژن TEM در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت دارویی چندگانه

			SHV		Total
			P	N	
MDR	P	Count	36	26	62
		% within MDR	58.1%	41.9%	100.0%
		% within INT	87.8%	44.1%	62.0%
		% of Total	36.0%	26.0%	62.0%
	N	Count	5	33	38
		% within MDR	13.2%	86.8%	100.0%
		% within INT	12.2%	55.9%	38.0%
		% of Total	5.0%	33.0%	38.0%
Total		Count	41	59	100
		% within MDR	41.0%	59.0%	100.0%
		% within INT	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	41.0%	59.0%	100.0%

بحث: مطالعات مختلف انجام شده در اقصی نقاط جهان حاکی از افزایش روز افزون سویه هایی با مقاومت دارویی چند گانه (Multi-Drug-Resistance MDR) است که نسبت به طیف وسیعی از داروهای مصرفی در بیمارستان ها مقاومت نشان می دهند. سودوموناس آئروژینوزا با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در سالهای اخیر افزایش روزافزون داشته اند و مشکلات فراوانی را برای پزشکان بالینی، میکروب شناسان و متخصصین کنترل عفونت ایجاد کرده اند. بر اساس مطالعات انجام شده یکی از دلایل مهم در بروز و انتقال ژنهای مقاومت وجود عناصر سیار ژنتیکی در ایزوله های مقاوم است. گزارش شده است که بخش عمده ای از ژن های مقاومت از جمله بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، متالوبتالاکتامازها و بخش عمده های از ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزید ها بر روی یکی از مهمترین عناصر سیار ژنتیکی-اینترگون ها- حضور دارند. نقش این ارگانسیم های در بخش های بحرانی بیمارستانی به ویژه بخش های مراقبت ویژه (ICU) از اهمیت بالاتری برخوردار است. در سالهای اخیر این ارگانسیم ها غالباً به سبب پتانسیل و کسب فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی غالباً ماهیت و الگوی مقاومت دارویی چندگانه کسب کرده اند که این امر مشکلات فراوانی را برای پزشکان، متخصصان عفونی و کنترل عفونت در کلینیک و بیمارستان ها ایجاد کرده است. در حال حاضر چندین تیپ از این آنزیم ها در گونه های سودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است که شامل بتالاکتامازهای وسیع الطیف کلاس A (مانند تیپ های TEM، SHV، PER، CTX-M، GES، کاربنی سیلیناز PSE (CARB) و VEB) و کلاس D (مانند تیپ های OXA) هستند (۱۵). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که بر خلاف گونه های انتروباکتریاسیه که در آنها تیپ های TEM و SHV شایع تر هستند در سودوموناس آئروژینوزا تیپ های OXA، PSE و PER به نسبت از شیوع بالاتری برخوردار هستند (۲۷، ۲۸).

در مجموع مطالعات مختلفی که در سراسر جهان شیوع کلاس‌های مختلف اینتگرونی و محتوی آنها از نظر وجود فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی بررسی کرده‌اند نتایج متفاوتی حاصل شده است. به طوری که شیوع اینتگرون کلاس یک در باکتری‌های بیماریزای گرم منفی از ۲۸/۵ درصد تا ۸۹/۲ درصد گزارش شده است (۷۰-۷۴). در مجموع نتایج حاکی از آن است که شیوع اینتگرون‌ها در ایزوله‌های بیمارستانی و حتی اکتسابی از جامعه در نواحی جغرافیایی مختلف، جمعیت‌های مختلف و حتی در بخش‌های مختلف بیمارستانی به میزان معنی‌داری متفاوت است.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، در مجموع ۴۱٪ از ایزوله‌ها دارای اینتگرون کلاس یک بودند. همچنین ۶۲ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که در این میان ۳۶ ایزوله (۵۸٪) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند.

نتایج این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات از نظر شیوع اینتگرون کلاس یک، آمار متفاوتی را نشان داد به طوری که در مقایسه با برخی از مطالعات از آماری بالاتری برخوردار بود از جمله مطالعه Xu و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در چین که مشخص شد که ۴۵/۸٪ از ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۱). همچنین در مقایسه با دیگر مطالعه‌ی از چین در سال ۲۰۰۷ که توسط Chen و همکارانش که در سال ۲۰۰۷ انجام شد، مشخص شد که ۳۸٪ از ایزوله‌ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۲). Poonsuk و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با بررسی حضور اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در تایلند گزارش کردند که در مجموع ۳۱/۸٪ درصد از ایزوله‌ها حاوی اینتگرون کلاس یک بودند (۶۴) و در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Fonseca و همکارانش بر روی ۱۰۱ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا در برزیل انجام شد مشخص شد که ۴۴ ایزوله (۴۱/۵٪) درصد از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۵).

از مجموع ۴۱ ایزوله دارای اینتگرون، ۳۶ ایزوله (۸۸٪) الگوی مقاومت دارویی چندگانه نشان دادند. نتایج این مطالعه با نتایج دیگر مطالعه ای که در این زمینه انجام شد همخوانی قابل توجهی دارد. در این راستا مطالعه ای که توسط Xu و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد مشخص شد که ۹۳٫۲٪ از ایزوله های حاوی اینتگرون کلاس ۱ الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که بر نقش این عناصر سیار ژنتیکی در بروز و انتقال فاکتور های مختلف مقاومت دارویی و ایجاد الگوی مقاومت دارویی چندگانه دارد (۶۱).

در این مطالعه اکثر ایزوله ها حاوی اینتگرون از بخش ICU جداسازی شدند که در مقایسه با نتایج اکثر مطالعاتی که در این زمینه انجام شد، همخوانی دارد. به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه و کاتتر، مواجه بودن بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتاً نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیزم های مقاوم در این بخش می باشد.

در این مطالعه با بررسی ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در مطالعه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین مقاومت به داروهای بتالاکتام و حضور اینتگرون کلاس یک وجود داشت که در مقایسه با سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شد ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به سفالوسپورین ها گزارش شد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Chen و همکارانش در چین انجام شد با بررسی بر روی ۷۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا در این زمینه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون در ایزوله های مورد مطالعه و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم و سفپیم وجود داشت (۶۲).

در دیگر مطالعه ی که توسط GU و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در این زمینه انجام شد با بررسی بیشتر الگوی مقاومت دارویی در دو گروه حاوی و فاقد اینتگرون کلاس یک مشخص شد که اختلاف معنی داری مابین حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی به ویژه نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مشاهده شد. به طوری که ایزوله ای دارای اینتگرون به طور معنی داری نسبت به آنتی بیوتیک های پِپراسیلین، پِپراسیلین-تازوباکتام، سفتازیدیم، سفپیم، آزترونام، ایمو پنم مقاومت بالاتری نشان دادند (۶۳). در مجموع این موضوع خیلی دور از انتظار نیست زیرا براساس مطالعات انجام شده بخش عمده ای از ژن های بتالاکتاماز توسط اینتگرون کلاس یک انتقال می یابند. ژن های بتالاکتامازهای تیپ OXA و متالوبتالاکتامازها و برخی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) با قرارگیری بر روی کاست های ژنی توسط اینتگرون کلاس یک انتقال می یابند که نهایتاً مقدمات مقاومت دارویی نسبت به طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف، پنی سیلین ها، ترکیبات مهارکننده بتالاکتامازها و حتی کرباپنم ها را فراهم می سازند (۵۰).

در ادامه مطالعه همچنین مشخص شد که ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده آمینوگلیکوزیدها وجود داشت که نتایج حاصل از آن با نتایج سایر مطالعات مشابه که در این زمینه انجام شد همخوانی داشت.

به طوری که در مطالعه Chen و همکارانش در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که ارتباط معنی داری بالینی حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا به داروهای خانواده آمینوگلیکوزید وجود داشت (۶۲). و در مطالعه Gu و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نیز نتایج مشابهی بدست آمد بدین ترتیب که ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حاوی اینتگرون در این مطالعه در مقایسه با ایزوله های بدون اینتگرون به میزان معنی داری در برابر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند (۶۳).

ارتباط مابین مقاومت به حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به داروهای خانواده آمینوگلیکوزیدها خیلی بعد از انتظار نیست چرا که براساس مطالعات که در این زمینه انجام شده است مشخص شد که بخش عمده ای از ژن های ژنی مقاومت آمینوگلیکوزیدها از جمله (ژن های acc و aad) بر روی اینتگرون کلاس یک انتقال می یابند (۶۳).

در این مطالعه ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده کینولون ها مشاهده شد. نتایج این مطالعه با نتایج سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شد همخوانی قابل توجهی دارد. به طوری که در مطالعه Chen و همکارانش در سال ۲۰۰۹ و Xu همکارانش در سال ۲۰۰۷ ارتباط معنی داری بدین منظور گزارش شد (۶۱، ۶۲). نتایج این بخش از مطالعه نیاز به بررسی بیشتری دارد زیرا براساس مطالعات انجام شده در خصوص مکانیسم مقاومت به کینولون ها مشخص شده است که مقاومت به کینولون ها غالباً به واسطه جهش های نقطه ای در ژن های کروموزومی اتفاق می افتد و در سال های اخیر نیز مقاومت نسبت به این داروها نیز به واسطه ژنهای پلاسمیدی qnr نیز از سراسر جهان شناسایی شده و گزارش می شوند. اما در سالهای اخیر گزارشاتی مبنی بر نقش اینتگرون ها و پلاسمید های وابسته وجود دارد که با کد کردن پروتئین هایی باعث افزایش نفوذپذیری سلول ها در برابر داروهای بتالاکتام و کینولون می شوند لذا با در نظر گرفتن این نقش اینتگرون ها در بروز مقاومت به کینولون ها نیاز به انجام مطالعات بیشتر ضروری است (۷۵).

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاکی از آمار قابل توجه حضور اینتگرون کلاس در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جمع آوری شده از بیمارستان های مورد مطالعه است. با توجه به نقش حضور اینتگرون کلاس یک، در انتشار فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی در برابر آنتی بیوتیک های مهمی از جمله داروهای بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین لذا لزوم توجه بیشتر به آنها ضروری است. در عین حال، به سبب ماهیت سیار اینتگرون ها و چرخش آن ما بین

گونه‌های مختلف باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی، به کارگیری از ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری است.

نتایج نهایی حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن TEM در مراکز بیمارستانی مورد مطالعه شیوع فراوانی یافته‌اند. براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه، ۶۲ درصد از ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا با الگوی مقاومت دارویی چندگانه جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستانی از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. با توجه به اینکه ایزوله‌های حاوی اینتگرون غالباً "از بخش ICU بیمارستان‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شدند امید آن است که با بهره‌گیری از الگوی صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک، و محدودسازی استفاده از داروهای بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، و به کارگیری برنامه‌های چرخشی آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت شاهد کاهش حضور این ارگانیسم‌های مقاوم در بخش‌های مختلف بیمارستانی باشیم.

پیشنهادات:

۱. از آنجائیکه در این مطالعه فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد پیشنهاد می شود جهت تکمیل مطالعه و شناسایی قطعی مکانیسم های های مقاومت، کاست های ژنی موجود در اینتگرون ها با استفاده از روش های ملکولی بررسی شوند.

۲. پیشنهاد می شود که فراوانی دیگر کلاس های اینتگرون نیز در این ایزوله ها بررسی شوند و نقش احتمالی آنها در بروز فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی نیز بررسی شود.

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology. United States.25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010; Chapter15, Page 219.
2. Balcht, Aldona & Smith, Raymond (1994). *Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment*. Informa Health Care. pp. 83–84. ISBN 0-8247-9210-6.
3. Jones MV, Herd TM, Christie HJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. Microbios. 1989; 58(234):49-61.
4. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2000 Jul; 2(9):1051-60.
5. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive Care Med. 2007 Jul; 33(7):1155-61.
6. Lutz JK, Lee J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. Int J Environ Res Public Health. 2011 Feb; 8(2):554-64.
7. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis. 2005 Aug; 18(4):306-13.
8. Sarlangue J, Brissaud O, Labrèze C. Clinical features of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Arch Pediatr. 2006 Oct; 13 Suppl 1:S13-6.
9. Robertson DM, Parks QM, Young RL, Kret J, Poch KR, Malcolm KC, Nichols DP, Nichols M, Zhu M, Cavanagh HD, Nick JA. Disruption of Contact Lens–

- Associated *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Formed in the Presence of Neutrophils. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Apr 27; 52(5):2844-50.
10. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005 Jul; 11 Suppl 4:17-32.
 11. Singh V, Arora V, Alam MJ, Garey KW. Inhibition of biofilm formation by esomeprazole in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Aug; 56(8):4360-4.
 12. Fred C. Tenover, PhD .Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria . The American Journal of Medicine (2006) Vol 119 (6A), S3–S10
 13. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jan; 50(1):43-8.
 14. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on Treatment .Drug Resist Updat. 2000 Aug; 3(4):247-255.
 15. Hancock RE, Speert DP. Antibioyic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat. 2000 Aug; 3(4):247-255.
 16. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001; 47(3):247-50.
 17. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE.. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob Agents Chemother. 1999 May;43(5):1085-90.
 18. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002 Mar 1;34(5):634-40..

19. Köhler T, Epp SF, Curty LK, Pechère JC.. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1999 Oct;181(20):6300-5..
20. Hancock RE, Brinkman FS. Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol 2002; 56:17-38.
21. McGowan, J. E., Jr. Resistance in nonfermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Infect Control; 2006: 34, S29-S37.
22. Pentti Huovinen .Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole .Clinical Infectious Diseases 2001; 32:1608–14
23. D M Livermore .beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8(4):557.
24. Ambler, R. P. (1980). The structure of b-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289, 321–331.
25. Barbosa TM, Levy SB.The impact of antibiotic use on resistance development and persistence .Drug Resist Updat. 2000 Oct; 3(5):303-311.
26. Svara F, Rankin DJ.The evolution of plasmid-carried antibiotic Resistance . BMC Evol Biol. 2011 May 19; 11(1):130.
27. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995 Feb; 15(4):593-600. Review.
28. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol. 2002 Jul; 292(2):115-25.
29. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. 2010 Jan; 118(1):1-36.
30. Giamarellou H. Fourth generation cephalosporins in the antimicrobial chemotherapy of surgical infections. J Chemother. 1999 Dec; 11(6):486-93. Review

31. Moellering RC Jr, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1989 Sep; 24 Suppl A: 1-7.
32. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New b-Lactamases .N Engl J Med. 2005 Jan 27; 352(4):380-91.
33. Nordmann, P. & Guibert, M. (1998). Extended-spectrum b-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 42, 128–131.
34. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum b-lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14, 933–951.
35. Mugnier, P., Dubrous, P., Casin, I., Arlet, G. & Collatz, E. A TEM-derived extended-spectrum b-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother.1996; 40, 2488–2493.
36. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type b-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:2593-601.
37. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, et al. A complex mutant of TEM-1 b-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an Escherichia coli clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1322-5.
38. Jacoby G, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant b-lactamases. (Accessed January 3, 2005, at <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.)
39. Naas, T., Philippon, L., Poirel, L., Ronco, E. & Nordmann, P. An SHV-derived extended-spectrum b-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43, 1281–1284.
40. Kuzin AP, Nukaga M, Nukaga Y, Hujer AM, Bonomo RA, Knox JR. Structure of the SHV-1 b-lactamase. Biochemistry 1999; 38: 5720-7.

41. Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & Hawkey, P. M. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum b-lactamases in gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48, 839–852.
42. Bonnet R. Growing group of extended spectrum b-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan; 48(1):1-14.
43. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):306-25.
44. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1-11.
45. Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A.-T. & Collatz, E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum b-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42, 3113–3116.
46. Mugnier, P., Podglajen, I., Goldstein, F. W. & Collatz, E. Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded b-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 1998; 144, 1021–1031.
47. Naas, T. & Nordmann, P. OXA-type b-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999; 5, 865-879.
48. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to impenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22.
49. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(2):223-32.
50. Gerhard F. Weldhagen. Integrons and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23 (2004) 556–562
51. Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16, 430–450.
52. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: A Comprehensive Review .*Am Fam Physician.* 2002 Feb 1; 65(3):455-64.

53. Hooper DC. .Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance .Emerg Infect Dis. 2001 Mar-Apr; 7(2):337-41. Review.
54. Robillard NJ, Scarpa AL. Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32(4):535-9.
55. Jacob Strahilevitz, George A. Jacoby, David C. Hooper and Ari Robicsek Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat . Clin. Microbiol. Rev. 2009, 22(4):664.
56. Severino P, Magalhães V.D. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. Res Microbiol, 2002; 153, 221-6.
57. Patzer, J. A., Toleman, M. A., Grzesik, A., Dzierzanowska, D. & Walsh, T. R. (2005). The diverse integron structures disseminating VIM genes in Poland. Clin Microbiol Infect 11 (Suppl. 2), 100.
58. Poirel, L., Gerome, P., De Champs, C., Stephanazzi, J., Naas, T. & Nordmann, P. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding extended-spectrum variant of OXA-2 b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46, 566–569.
59. Yatsuyanagi, J., Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K. & Enomoto, K. Class 1 integron containing metallo-b-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48, 626–628.
60. Severino P, Magalhães V.D. Integrons as tools for epidemiological studies. Clin Microbiol Infect, 2004; 10, 156-62.
61. Xu Z, Li L, Shirtliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. J Clin Microbiol. 2009; 230-4.
62. Chen J, Su Z, Liu Y, Wang S, Dai X, Li Y, Peng S, Shao Q, Zhang H, Wen P, Yu J, Huang X, Xu H. Identification and characterization of class 1 integrons

- among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. Int J Infect Dis, 2009; 13, 717-21.
63. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, Zhao W. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol, 2007; 45, 241-3.
 64. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples. Vol 43 No. 2 March 2012
 65. Fonseca E.L, Vieira V.V, Cipriano R, Vicenta A. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. Immunology and Medical Microbiology. 2005; 44, 303-9.
 66. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, Azhari F.. Prevalence of Class 1 Integron among Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran. Pol J Microbiol. 2012; 61(1):57-60.
 67. Hall GS. Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G: Textbook of diagnostic microbiology, 3th ed. Ohio: Saunders – Elsevier 2007 p. 564-584.
 68. Clinical and Laboratory Standard Institute. (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A9. Wayne, PA.
 69. Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. J Antimicrob Chemother. 2003 Feb; 51(2):317-21.
 70. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, et al. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005; /55:/639-44.

71. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18:761-70.
72. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME. Class 1 integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Dec; 42(6):689-96.
73. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep; 45(9):2658-61.
74. Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 1995 Fall; 1(3):195-202.
75. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J.. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun; 59(6):1210-5.

Prevalence of type TEM among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Motahari Hospital, Tehran

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important causative agents of nosocomial infections especially in ICU and burn units. In recent years, there are increasing reports of multidrug resistant *P. aeruginosa* outbreaks in clinical settings worldwide class 1 integrons have been found to be the most prevalent in clinical isolates of *P. aeruginosa* that confer resistance to known antibiotics. The aim of this study was to determine the frequency of class1 integron among multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates.

Methods: One hundred and thirty seven non duplicated clinical isolates were collected from Qazvin and Theran hospitals. All isolates were identified using standard laboratory methods. Antimicrobial susceptibility profiles were determined against the selected antimicrobilas using the standard Kirby Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. PCR assay was performed for detection class 1 integron. The chi-square test was used to determine the association between integron carriage and antimicrobial susceptibility patterns.

Results: Among one hundred isolates that studied, 67 isolates exhibited the MDR pattern. Thirty six (58%) of MDR isolates were found to have the class 1 integron. Analysis of data revealed a significant association between MDR pattern and presence of class 1 integron ($p < 0.001$). The results also showed that integron-positive isolates were statistically more resistant to aminoglycoside, quinolons and beta-lactam compounds.

Discussion: This study showed high prevalence of class 1 integron among *P. aeruginosa* isolated from our hospital settings. Considering the significant association between integron carriage and reduced susceptibility to variety of antibiotics, use of appropriate infection control strategy and a regular surveillance system is necessary to prevent further spread of infection by these organisms.

Keywords: *P. aeruginosa*, Multidrug resistant, Integron class 1